



УДК 57.056:57.036:57.021

Регуляция экспрессии металлотиионеина *CUP1* на уровне трансляции у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

А. А. Рубель^{1,2}, В. В. Игнатова¹, Д. Е. Полев¹, А. Ф. Сайфитдинова¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики

им. Н. И. Вавилова РАН, Санкт-Петербург

E-mail: arubel@mail.ru

Аннотация. Настоящая работа направлена на выявление факторов, влияющих на экспрессию генов под контролем промотора *CUP1* на уровне трансляции в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Для этого был применён ряд репортерных систем, позволяющих проводить количественную оценку влияния различных факторов на эффективность трансляции мРНК, несущей 5'-НТО *CUP1*, т. е. оценивать продукцию белка в нативной изоформе в пересчёте на одну клетку. Полученные результаты значимы для понимания феномена посттранскрипционной регуляции экспрессии генов у эукариот, а также могут найти применение в биотехнологии для повышения эффективности продукции рекомбинантных эукариотических белков.

Ключевые слова: металлотиионин, *CUP1*, промотор, усиление трансляции.

Введение

Увеличение уровня продукции рекомбинантных белков в клетках про- и эукариот является одной из важнейших задач современной биотехнологии. Решить данную задачу, увеличив транскрипционную активность генов, удаётся далеко не всегда, так как концентрация белков в клетках зависит от количества соответствующих молекул мРНК лишь на 20–40 % [16], в остальном же она определяется всем многообразием процессов, следующих за транскрипцией [18]. В значительной мере регуляция биосинтеза белков в живых клетках определяется эффективностью инициации трансляции соответствующих мРНК. Известно, что рибосома сама по себе имеет средство к определённым последовательностям мРНК, при этом среди синтетических полирибонуклеотидов вакантная рибосома лучше всего связывает полиуридиловую кислоту [5]. Высокая эффективность инициации трансляции на таких матрицах мРНК определяется отсутствием у них стабильной вторичной и третичной структур. У эукариот эффективность матрицы сильно падает при наличии развитой вторичной структуры в лидерной последовательности, а также, если 5'-НТО имеет длину больше определённого предела [13; 14]. Лидерный район может содержать как негативные (стабильные шпильки, AUG триплеты и рамки считывания), так и позитивные сигналы (трансляционные энхансеры). К числу известных сигналов общего характера относят контекст стартового кодона трансляции, влияющий на его распознава-

ние рибосомами [12]. Было высказано предположение, что увеличение эффективности инициации трансляции мРНК, имеющих сложную вторичную структуру возможно при участии мРНК-геликаз [22], таких как eIF4A и eIF4B, работающих в комплексе с белками eIF4E, eIF4F и eIF4G. В соответствии с геликазной теорией регуляции экспрессии на посттранскрипционном уровне, мРНК, лишённые вторичной структуры в районе 5'-НТО, в меньшей степени подвержены регуляции на уровне сканирования мРНК и инициации трансляции [11]. Вместе с тем, изменение скорости инициации трансляции мРНК может быть обусловлено разным сродством факторов инициации трансляции к разным 5'-НТО. Известно, что избирательное влияние на активность трансляции мРНК оказывают специфические регуляторные белки, которые специфическим образом связываются с регуляторными элементами 5'-НТО мРНК вблизи иницирующего кодона. У ряда вирусных генов, а также у некоторых генов высших эукариот в области 5'-НТО выявлены последовательности, которые позитивно регулируют эффективность трансляции соответствующих мРНК [20]. Такие же последовательности были недавно обнаружены у нескольких дрожжевых генов [26]. В качестве регуляторов, модулирующих трансляцию определённых мРНК, могут выступать антисмысловые последовательности к ним, продукты трансляции этих мРНК, либо белки, выполняющие в клетке другие функции. Примером может служить негативная регуляция количества мРНК, кодирующей белок ферритин, осуществляемая ферментом аконитазой, который в митохондриях катализирует две реакции цикла Кребса [9]. Для некоторых 5'-НТО отмечено связывание с белковыми факторами, контролирующими трансляцию. Так, например, дрожжевой шаперон *Zuotin* связывается с НТО мРНК гена *TFIID* и позитивно регулирует его трансляцию [10]. Интересные данные получены при исследовании растительного шаперона *Hsp101*, было установлено, что он связывается с вырожденным тандемным повтором (CAA)_n, расположенным в 5'-НТО мРНК вируса табачной мозаики и позитивно регулирует трансляцию этой вирусной последовательности [23].

Ранее нами был описан феномен регуляции экспрессии генов в клетках дрожжей сахаромикетов, находящихся под контролем промотора *CUP1*, на уровне трансляции [2]. Было показано, что эффективность трансляции репортерных белков с мРНК, несущих 5'-НТО *CUP1*, зависит от шаперона *Hsp104*. Проведённый в дальнейшем анализ показал, что перед стартовым кодоном в 5'-НТО мРНК, транскрибируемой с промотора гена *CUP1*, расположены четыре тандемных повтора (CAAU), которые могут служить регуляторными последовательностями [2], однако механизм регуляции на уровне трансляции для мРНК этих генов так и не был объяснён. Целью данной работы являлось исследование роли 5'-НТО промотора гена *CUP1* в регуляции экспрессии репортерных генов на уровне трансляции в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Материалы и методы

Для исследований были использованы штаммы дрожжей *S. cerevisiae* ВУ4742 и ВУ4742 (*pho3Δ*) (Invitrogen, США). Для культивирования дрожжей использовали стандартные методики [4; 19], для количественной оцен-

ки активности конститутивной кислой фосфатазы Pho3 использовали среду МФО [1]. Кроме того, был использован спектр молекулярно-генетических и биохимических методов для дизайна и конструирования новых последовательностей ДНК с заданными свойствами, введения их в клетки и последующего качественного и количественного анализа [3; 6; 7; 15; 21]. Для анализа потенциальных вторичных структур РНК использовали программу Sfold 2.1 (Wadsworth Bioinformatics Center). Аналитическую работу с картами плазмид и генетических последовательностей проводили с использованием программного обеспечения VectorNTI Advance 10. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программной среды R (R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Для проверки достоверности полученных результатов применяли статистические тесты с использованием t-критерия Стьюдента. Для графического изображения активности фермента использовалась функция построения графиков типа «boxplot», построение проводили на основе значения медианы, поскольку данная характеристика более устойчива (по отношению к среднему арифметическому значению) при попадании в выборку выпадающих значений.

Результаты

В ходе предыдущих исследований нами было выявлено, что перед стартовым кодоном в 5'-НТО мРНК, транскрибируемой с промотора гена *CUP1*, расположены четыре тандемных повтора (CAAU), которые могут служить регуляторными последовательностями [2]. Мы проанализировали последовательность 5'-НТО *CUP1* с помощью программы Sfold 2.1 (Wadsworth Bioinformatics Center) и обнаружили, что для неё наиболее вероятно вторичная структура в виде односторонней петли, которая образуется крайне А-обогатённым участком и четырьмя повторами (CAAU).

Дрожжевой штамм BY4742 был трансформирован плазмидой PCUP1mut-PG, несущей репортерный ген под контролем изменённого промотора *CUP1*, в котором нарушен участок четырёх повторов (CAAT), при этом общая длина промотора не изменена. Эксперимент показал, что такие изменения приводят к полному нарушению продукции репортерного белка. На следующем этапе мы решили оценить роль участка, несущего повторы (CAAT) в случае использования другого промотора. В качестве основы для этих экспериментов был выбран конститутивный, широко используемый промотор *GPD*, контролирующий транскрипцию гена *TDH1* дрожжей *S. cerevisiae*. Штамм BY4742 был трансформирован независимо плазмидами, несущими мутантный промотор *GPD* с изменённой областью 5'-НТО: собственная 5'-НТО *GPD* была заменена на 5'-НТО *CUP1* и введены повторы (CAAT) непосредственно в промотор *GPD* соответственно. В обоих случаях методами Вестерн-блот гибридизации и флуоресцентной микроскопии было показано, что продукция репортерного белка в полученных трансформантах отсутствует.

Для дальнейшей работы был выбран подход, который использовали авторы работы о взаимодействии Hsp101 с 5'-НТО мРНК вируса табачной мо-

заики – добавление полноразмерной последовательности 5'-НТО после интактного промотора. Плазмидами, в которых репортерный ген встроен под контроль модифицированных промоторов, содержащих добавочную 5'-НТО из промотора гена *CUP1* между промотором и репортерным геном, был трансформирован дрожжевой штамм ВУ4742. В качестве контроля использовали штамм ВУ4742, трансформированный плазмидами с немодифицированными промоторами.

С помощью метода ПЦР в реальном времени был проведён сравнительный анализ количества мРНК репортерных генов, содержащих немодифицированную 5'-НТО и содержащих добавочную последовательность 5'-НТО *CUP1* перед стартовым кодоном (табл. 1). Из данных, представленных в табл. 1, видно, что количество мРНК при встраивании 5'-НТО *CUP1* и репортерным геном снижается почти вдвое. При встраивании 5'-НТО *CUP1* между промотором *GPD* и репортерным геном происходит менее существенное снижение количества мРНК.

Таблица 1

Результаты определения количества мРНК при встраивании дополнительной последовательности 5'-НТО между промоторами *CUP1* и *GPD* и репортерным геном дрожжей *S. cerevisiae*

Промотор	ΔCt^*		$\Delta \Delta Ct^{**}$	$2^{-\Delta \Delta Ct}^{***}$
	Дополнительная 5'-НТО	Норма		
CUP1	1,52±0,534	0,40±0,380	1,12	0,46
GPD	1,70±0,838	1,29±0,518	0,41	0,75

Примечания: * ΔCt – разница значений пороговых циклов мРНК контрольного и исследуемого гена; ** $\Delta \Delta Ct$ – разница значений ΔCt при встраивании между промотором и репортерным геном дополнительной 5'-НТО и при использовании нормальных промоторов; *** $2^{-\Delta \Delta Ct}$ – соотношение количества копий исследуемой мРНК в контроле и опыте [17]

Таблица 2

Данные по удельной активности кислой фосфатазы *PHO3* в разных последовательностях промоторов в пересчёте на клетку

№	Генетическая конструкция			
	$P_{CUP1-Pho3(HIS)}$	$P_{CUP1-CUPHTO-Pho3(HIS)}$	$P_{GPD-Pho3(HIS)}$	$P_{GPD-CUPHTO-Pho3(HIS)}$
1	0,71	0,40	1,92	2,55
2	0,56	0,49	2,14	2,43
3	0,58	1,04	1,86	2,83
4	0,45	0,44	1,81	2,48
5	0,71	0,35	1,92	3,44
6	0,56	0,45	2,14	3,21
7	0,58	0,40	1,86	3,09
8	0,45	0,33	1,81	3,03
Медиана	0,57	0,42	1,89	2,93
Среднее значение	0,58	0,49	2,14	2,88

Для изучения влияния добавочной 5'-НТО *CUP1* на уровень продукции репортерного белка был использован количественный метод определения активности кислых фосфатаз с использованием *PHO3* в качестве репортерного гена. На основе полученных данных можно говорить о том, что добавление 5'-НТО *CUP1* перед промотором *CUP1* приводит к незначительному (статистически недостоверному) снижению уровня продукции репортерного белка в нативной изоформе, а добавление 5'-НТО *CUP1* перед промотором *GPD* приводит к достоверному усилению продукции репортерного белка (табл. 2).

Обсуждение

Изменение последовательности промотора всегда связано с риском полного нарушения его работоспособности. Именно это мы и получили при попытке видоизменять участки промоторов *CUP1* и *GPD*. При введении дополнительной последовательности 5'-НТО *CUP1* между промотором и репортерным геном наблюдается значительное снижение транскрипции: в случае модификации промотора *CUP1* до 46 % от уровня транскрипции репортерного гена с интактного промотора *CUP1*, в случае же модификации промотора *GPD* – до 75 %. Возможно, подобный эффект связан с введением в промотор дополнительных регуляторных сайтов, деятельность которых может приводить к нарушению координированного процесса регуляции транскрипции. Кроме того, увеличивается длина участка от сайта инициации транскрипции до начала рамки считывания гена, причём такое удлинение для промоторной области гена *GPD* значительно меньше, чем для промотора *CUP1* в силу исходного различия в длине этих участков. Возможно, поэтому при введении дополнительной последовательности 5'-НТО *CUP1* после промотора *GPD* наблюдаемое снижение транскрипции репортерного гена менее выражено, чем при удлинении промоторной области *CUP1*.

При анализе уровня продукции репортерного белка методом измерения ферментативной активности с использованием конститутивной кислой фосфатазы дрожжей *Pho3* в качестве репортерного белка мы получили данные о влиянии дополнительной последовательности 5'-НТО *CUP1* на экспрессию генов на уровне трансляции, причём оценивали только уровень продукции белка в нативной изоформе, так как измеряли ферментативную активность кислой фосфатазы. При добавлении 5'-НТО к промотору *CUP1* нам не удалось зарегистрировать усиления продукции репортерного белка *Pho3*. Однако при модификации промотора *GPD* за счёт добавления 5'-НТО мРНК *CUP1* мы наблюдали увеличение продукции белка до 155 % от уровня экспрессии репортерного гена по сравнению с интактным промотором *GPD* (рис.).

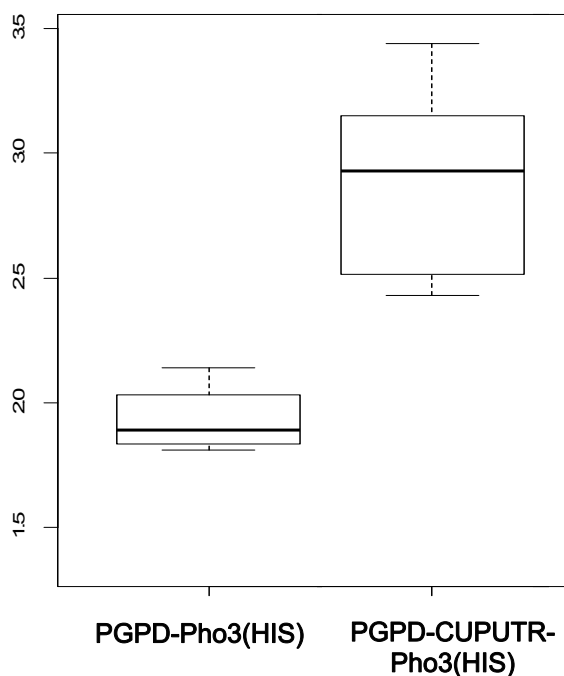


Рис. Распределение значений удельной активности кислой фосфатазы Pho3 при встраивании репортерного гена под немодифицированный промотор *GPD* и под промотор *GPD*, содержащий дополнительную 5'-НТО *CUP1* между промотором и репортерным геном. На оси ординат представлены значения удельной активности фермента, p -value = $1,608e-05$ для t -критерия Стьюдента

Заключение

Полученные нами в ходе исследования результаты имеют не только фундаментальное значение для понимания механизмов регуляции эффективности экспрессии генов на уровне трансляции, но и могут найти применение в биотехнологии. Для гетерологичной экспрессии используют различные системы: бактерии, дрожжи, растения, насекомых и млекопитающих. Одним из наиболее удобных продуцентов являются дрожжи *S. cerevisiae*. Целый комплекс факторов позволяет сделать выбор в пользу данного объекта. Среди них относительная простота и низкая стоимость культивирования, отсутствие в клетках эндотоксинов и патогенов для человека, сходство большинства посттрансляционных модификаций белков у дрожжей и высших эукариот, способность к секреции из клетки чужеродных белков (при этом *S. cerevisiae* выделяют в среду мало собственных белков и не выделяют протеазы) [8]. Последнее свойство существенно для наработки белков, которые синтезируются в форме предшественников и должны секретироваться из клетки при сопутствующих модификациях, иначе они переходят в неактивную и нерастворимую форму. В то же время широкое применение дрожжей в биотехнологии ограничено относительно невысоким уровнем продукции белка [24; 25]. В этой связи усиление продук-

ции белка является одной из актуальных задач биотехнологии. Одним из подходов решения этой проблемы может быть использование модифицированных промоторов, несущих сигналы для преимущественной инициации трансляции. Дрожжевой промотор *GPD* относится к числу наиболее часто используемых в биотехнологии для продукции рекомбинантных белков в дрожжах. Наши данные свидетельствуют о том, что использование модификации промотора за счёт введения дополнительной 5'-НТО мРНК *CUP1* в клетках дрожжей *S. cerevisiae* будет приводить к увеличению продукции белка. Стоит отметить, что частой проблемой при использовании штаммов-продуцентов является наработка большого количества белка, который является функционально неактивным. При использовании нашей системы модификации мы наблюдаем увеличение продукции белка в нативной изоформе. Однако из-за множественности эффектов подобной модификации на разных уровнях и несформированных окончательных представлений о механизмах описанного влияния на продукцию белка молекулярные основы этого феномена нуждаются в дальнейшем изучении.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, при поддержке гранта Президента РФ для молодых кандидатов наук (МК-1152.2013.4), а также за счёт средств СПбГУ. Для выполнения исследований использовалась приборная база Ресурсных центров СПбГУ «ЦКП ХРОМАС» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Список литературы

1. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / М. Г. Самсонова [и др.] // Генетика. – 1975. – Т. 11, № 9. – С. 104–115.
2. Дрожжевой шаперон Hsp104 регулирует экспрессию генов на посттранскрипционном уровне / А. А. Рубель [и др.] // Мол. биол. – 2008. – Т. 42, № 1. – С. 123–130.
3. Маниатис Т. Молекулярное клонирование: пер. с англ. / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
4. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов / И. А. Захаров [и др.]. – Л.: Наука, 1984. – 143 с.
5. Спириин А. С. Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка / А. С. Спириин. – М.: Высш. шк., 1986. – 304 с.
6. Характеристика кислых фосфатаз разных штаммов / М. В. Падкина [и др.]. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей. I // Генетика. – 1974. – Т. 10. – С. 100–111.
7. Antagonistic interactions between yeast chaperones Hsp104 and Hsp70 in prion curing / G. P. Newnam [et al.] // Mol Cell Biol. – 1999. – Vol. 19, N 2. – P. 1325–1333.
8. Buckholz R. Yeast systems for the expression of heterologous gene products / R. Buckholz // Current Opin Biotechnol. – 1993. – Vol. 4, N 5. – P. 538–542.
9. Cytosolic Aconitase and Ferritin Are Regulated by Iron in *Caenorhabditis elegans* / B. L. Gourley [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278. – P. 3227–3234.
10. Dna J molecular chaperone, stimulates cap-independent translation in yeast / S. Raychaudhuri [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2006. – Vol. 350. – P. 788–795.
11. General RNA binding proteins render translation cap dependent / Y. Svitkin [et al.] // EMBO J. – 1996. – Vol. 15. – P. 7147–7155.
12. *In vivo* evaluation of the context sequence of the translation initiation codon in plants / M. Lukaszewicz [et al.] // Plant Sci. – 2000. – Vol. 154, N 1. – P. 89–98.

13. Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs / M. Kozak // *Nucleic Acids Res.* – 1987. – Vol. 15. – P. 8125–8148.
14. Kozak M. Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes / M. Kozak // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1986. – Vol. 83. – P. 2850–2854.
15. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
16. Nie L. Correlation between mRNA and protein abundance in *Desulfovibrio vulgaris*: A multiple regression to identify of variations / L. Nie, G. Wu, W. Zhang // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2006. – Vol. 339. – P. 603–610.
17. Pfaffl M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR / M. W. Pfaffl // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol. 29, N 9. – P. 45.
18. Posttranscriptional expression regulation: what determines translation rates? / R. Brockmann [et al.] // *PLoS Computational Biology.* – 2007. – Vol. 3, N 3. – P. 531–539.
19. Rose M.D. Methods in yeast genetics / M. D. Rose, F. Winstone, P. Hieter // CSHL Press. – 1990. – 198 p.
20. Sachs A. B. Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes / A. B. Sachs, P. Sarnow, M. W. Hentze // *Cell.* – 1997. – Vol. 89. – P. 831–838.
21. Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. – N. Y. : Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. – 1626 p.
22. Sonenberg N. mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. Translational control / N. Sonenberg. – N. Y. : Cold Spring Harbor Lab. Press, 1996. – P. 245–269.
23. The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo* / D. R. Gallie [et al.] // *Nucleic Acids Research.* – 1987. – Vol. 15. – P. 3257–3273.
24. Vaccines based on whole recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells / A. Ardiani [et al.] // *FEMS Yeast Res.* – 2010. – Vol. 10, N 8. – P. 1060–1069.
25. Yeast systems biotechnology for the production of heterologous proteins / A. Graf [et al.] // *FEMS Yeast Res.* – 2009. – Vol. 9, N 3. – P. 335–348.
26. Zhou W. Transcript leader regions of two *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs contain internal ribosome entry sites that function in living cells / W. Zhou, G. M. Edelman, V. P. Mauro // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98. – P. 1531–1536.

Regulation of *CUP1* Metallothionein Expression at the Translational Level in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

A. A. Rubel^{1,2}, V. V. Ignatova¹, D. E. Polev¹, A. F. Saifitdinova¹

¹*Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg*

²*St. Petersburg Branch of N. I. Vavilov Institute of General Genetics RAS, Saint-Petersburg*

Abstract. Until recently it was assumed that the transcriptional activity of genes plays a key role in the regulation of gene expression. Whereas the regulation on the translation level was considered as only an additional step of different proteins balance correction used by cells in changing extracellular and intracellular environment. A large amount of evidence of a crucial contribution of the posttranscriptional regulation, especially in eukaryotes, has collected to the present moment. In this work we identify factors which may influence the expression of genes under the control of the *CUP1* promoter at the translational level in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. For this purpose we applied a number of

reporter systems allowing quantifying an influence of various factors on the efficiency of translation from mRNAs bearing 5'-UTR *CUP1*. This approach allowed us to evaluate the production of proteins in the native isoform in terms of a single cell. The results obtained are important for understanding of the phenomenon of the posttranscriptional regulation of gene expression in eukaryotes and can be applied for the improvement in recombinant proteins production in biotechnology.

Key words: metallothionein, CUP1, promoter, translation enhancement.

Рубель Александр Анатольевич
кандидат биологических наук, научный
сотрудник
Санкт-Петербургский государственный
университет
198504, г. Санкт-Петербург, Петергоф,
ул. Ботаническая, 17
тел.: (812)328–15–90
Санкт-Петербургский филиал
Института общей генетики
им. Н. И. Вавилова РАН
198504, г. Санкт-Петербург, Петергоф,
ул. Ботаническая, 17
тел.: +7 (812) 428–40–04
e-mail: arubel@mail.ru

Rubel Aleksandr Anatolyevich
Candidate of Sciences (Biology)
Research Scientist
Saint-Petersburg State University
17, Botanicheskaya st., Petergof,
Saint-Petersburg, 198504
tel.: (812)328–15–90
Saint-Petersburg Branch of N. I. Vavilov
Institute of General Genetics RAS
17, Botanicheskaya st., Petergof,
Saint-Petersburg, 198504
tel.: +7 (812) 428–40–04
e-mail: arubel@mail.ru

Игнатова Валентина Витальевна
техник-проектировщик
Санкт-Петербургский государственный
университет
198504, г. Санкт-Петербург, Петергоф,
ул. Ботаническая, 17
тел.: (812)328–15–90
e-mail: arubel@mail.ru

Ignatova Valentina Vitalyevna
Technician
Saint-Petersburg State University
17, Botanicheskaya st., Petergof,
Saint-Petersburg, 198504
tel.: (812)328–15–90
e-mail: arubel@mail.ru

Полев Дмитрий Евгеньевич
кандидат биологических наук, научный
сотрудник
Санкт-Петербургский государственный
университет
198504, г. Санкт-Петербург, Петергоф,
ул. Ботаническая, 17
тел.: (812)328–15–90
e-mail: arubel@mail.ru

Polev Dmitriy Evgenyevich
Candidate of Sciences (Biology)
Research Scientist
Saint-Petersburg State University
17 Botanicheskaya st., Petergof,
Saint-Petersburg, 198504
tel.: (812)328–15–90
e-mail: arubel@mail.ru

Сайфитдинова Алсу Фаритовна
кандидат биологических наук, доцент
Санкт-Петербургский государственный
университет
198504, г. Санкт-Петербург, Петергоф,
ул. Ботаническая, 17
тел.: (812)328–15–90
e-mail: a.saifitdinova@spbu.ru

Saifitdinova Alsu Faritovna
Candidate of Sciences (Biology)
Associate Professor
Saint-Petersburg State University
17, Botanicheskaya st., Petergof,
Saint-Petersburg, 198504
tel.: (812)328–15–90
e-mail: arubel@mail.ru