УДК 579.22, 579.24

ГИПЕРПРОДУКЦИЯ ПРОТЕАЗЫ HTRA ПОВЫШАЕТ ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК *BACILLUS SUBTILIS* В УСЛОВИЯХ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА И СТИМУЛИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ

Чернова Л.С., магистрант, Павлова А.С. студентка,
Каюмов А.Р., кандидат биологических наук, доцент
ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Институт Фундаментальной Медицины и Биологии,
г. Казань, Россия

Ключевые слова. *Htra, протеазы, белки теплового шока, Bacillus subtilis, температурный стресс, биопленка.*

В настоящей работе был получен штамм Bacillus subtilis с гиперпродукцией белка HtrA и охарактеризованы его физиологические особенности.

Введение. Htra (high temperature requirement A) – это индуцируемые тепловым шоком сериновые протеазы. Они осуществляют качественный белковый контроль, гидролизуя поврежденные белки [1]. У многих патогенных микроорганизмов протеазы HtrA являются фактором патогенности [2]. Так, например, у *Streptococcus mutans* HtrA необходима для биогенеза внеклеточных белков, развития генетической компетентности и образования биопленки для выживания в стрессовых условиях [3, 4, 5]. У млекопитающих снижение активности HtrA связано с такими тяжелыми заболеваниями, как артрит, рак, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера [6, 7, 8, 9, 11].

Цели. Оценить влияние гиперпродукции протеазы HtrA *Bacillus subtilis* в адаптации клеток бацилл к стресовым условиям.

Материал и методика. Оценку жизнеспособности клеток бацилл при температурном стрессе проводили с помощью дифференциального флюоресцентного окрашивания мертвых и живых клеток и Drop Plate анализа. Для оценки синтеза внеклеточного матрикса, использовали краситель Congo Red, окрашивающий аммилоидные белки матрикса [12]. Чтобы установить влияние HtrA на уровень экспрессии оперонов, участвующих в синтезе внеклеточного матрикса биопленки, были получены рекомбинантные штаммы с репортерными конструкциями eps-

LacZ и yqxM-LacZ. Способность повышенного синтеза HtrA также повлиять на протеом организма, в том числе и клеток, находящихся в составе биопленки, проверили с помощью 1D и 2D электрофореза.

Результаты исследований и их обсуждения. Оценка жизнеспособности клеток бацилл при высоких температурах показала, что при температуре свыше 60 ^{0}C жизнеспособность клеток штамма бацилл с гиперпродукцией белка HtrA повысилась в 6 раз по сравнению с исходным штаммом. Также в ходе исследования обнаружено различной степени роение колоний клетками *B.subtilis* с повышенным содержанием HtrA. Предполагается, что роение связано с кворум-зависимыми процессами, включая образование биопленок и синтез внеклеточного матрикса. Ранее методом окрашивания кристаллическим фиолетовым мы обнаружили способность штаммов с гиперпродукцией протеазы образовывать более плотные биопленки. Окрашивание клеток красителем Congo Red показало, что колонии клеток с гиперпродукцией белка характеризовались более интенсивным красным окрашиванием, что свидетельствовало о синтезе в матриксе амилоидов, а толщина окрашенной колонии была в 1,5 раза больше, чем у контрольного штамма. Уровень активности b-галактозидазы в прикрепленных клетках у полученных рекомбинантных штаммов с репортерными конструкциями eps-LacZ и yqxM-LacZ показал повышенную экспрессию eps оперона и гена *yqxM* и образование более плотной биопленки клетками гиперпродуцента HtrA. 1D и 2D электрофорезы также показали различия в протеомах рекомбинантного штамма и штамма дикого типа.

Заключение. Таким образом, повышенное содержание HtrA привело к повышению жизнеспособности клеток бацилл в условиях температурного стресса. Полученный штамм характеризуется образованием более плотной биопленки с повышенным содержанием внеклеточного матрикса. С помощью репортерных штаммов установлено, что при гиперпродукции протеазы наблюдается повышенный уровень экспрессии генов *eps* и *yqxM*, кодирующих компоненты матрикса биопленки, а также приводит к изменению протеомного профиля клеток, находящихся в составе биопленки. Вероятно, это связано с влиянием фермента на регуляторные процессы. Молекулярные механизмы повышения уровня синтеза матрикса биопленки в результате гиперпродукции протеазы HtrA пока остаются непонятными и требуют дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (Проект №15-14-00046).

Библиографический список:

1. Clausen, T. The HtrA family of proteases. Implications for protein composition and cell fate / T. Clausen, C. Southan, M. Ehrmann // Mol. Cell. - 2002. - V.10. - P.443–455.
2. Skorko-Glonek, J. HtrA Protease Family as Therapeutic Targets/ J. Skorko-Glonek, D. Zurawa-Janicka, T.Koper, M. Jarzab, D. Figaj, P. Glaza, B. Lipinska// Current Pharmatial Design. -2013. - V.19. - P.977-1009.
3. Kuramitsu, H. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics/ H. Kuramitsu // Crit. Rev. Oral Biol. Med.-1993.- V.4.-P.159-176.
4. Sang-Joon, A. Role of HtrA in Growth and Competence of *Streptococcus mutans* UA159/ A. Sang-Joon, José A. C. Lemos, R.A. Burne// Bacteriol.- 2005- V. 187(9)- P.3028–3038.
5. Yamashita, Y. Role of the Streptococcus mutans gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model / Y. Yamashita, W. H. Bowen, R. A. Burne, H. K. Kuramitsu // Infect. Immun.- 1993.- V.61.- P.3811-3817.
6. Grau, S. Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing / S. Grau, A. Baldi, R. Bussani, X. Tian, R. Stefanescu, M. Przybylski, P. Richards, S. A. Jones, V. Shridhar, T. Clausen, M. Ehrmann // Proc. Natl Acad. Sci. USA - 2005. - V.102. - P.6021–6026.
7. Milner, J. M. Emerging roles of serine proteinases in tissue turnover in arthritis / J. M. Milner, A. Patel, A. D. Rowan// Arthritis Rheum. - 2008. - V.58. - P.3644–3656.
8. Coleman, H. R. Age-related macular degeneration / H. R. Coleman, C. C. Chan, F. L. Ferris 3rd, E. Y. Chew// *Lancet* - 2008. - V.372. - P.1835–1845.
9. Walle, L.V. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. / L. V. Walle, M. Lamkanfi, P. Vandenabeele // *Cell Death Differ*. - 2008. - V.15. - P.453–460.Winston J. A. Shar-Pei Fever/ J. A. Winston, S. L. Vaden // Clinician's brief. -2013.-P.63.
10. Chien, J. HtrA serine proteases as potential therapeutic targets in cancer / J. Chien, M. Campioni, V. Shridhar, A. Baldi // Curr. Cancer Drug Targets. - 2009. - V.9. - P.451–468.
11. Hara, K. Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease / K. Hara, A. Shiga, T. Fukutake, H. Nozaki, A. Miyashita, A. Yokoseki, H. Kawata, A. Koyama, K. Arima, T. Takahashi,

M. Ikeda, H. Shiota, M. Tamura, Y. Shimoe, M. Hirayama, T. Arisato, S. Yanagawa, A. Tanaka, I. Nakano, S. Ikeda, Y. Yoshida, T. Yamamoto, T. Ikeuchi, R. Kuwano, M. Nishizawa, S. Tsuji, O. Onodera // N. Engl. J. Med. - 2009. - V.360. - P.1729–1739.

12. Winston, J. A. Shar-Pei Fever/ J. A. Winston, S. L. Vaden // Clinician's brief. -2013.- P.63.

THE HYPERPRODUCTION OF HTRA INCREASES THE SURVIVAL OF BACILLUS SUBTILIS CELLS IN STRESS CONDITIONS AND STIMULATES THE BIOFILM FORMATION

Chernova L., Pavlova A., Kajumov A.

Key words: *HtrA***,** *proteases, Bacillus subtilis, heat shock-induced, biofilm.*

HtrA proteases carry out the qualitative protein control by hydrolysis of denatured proteins. In many pathogenic bacteria they are apathogenicity factors. In Streptococcus mutans HtrA participates in quorum-dependent processes and a biofilm formation. Here we show that the hyperproduction of HtrA in Bacillus subtilis increases cell viability at high temperature. Also cells exhibited more intensive swarming and biofilm formation suggesting the enzyme's influence on regulatory processes.