

ЗНАЧЕНИЕ ПРОТЕИНАЗЫ HtrA В ОБРАЗОВАНИИ БИОПЛЕНКИ КЛЕТКАМИ *BACILLUS SUBTILIS*

Научный руководитель – Каюмов Айрат Рашитович

Чернова Л.С.¹, Шарафутдинов И.С.², Павлова А.С.¹

1 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра генетики, Казань, Россия; 2 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

HtrA (high temperature requirement A) - это индуцируемые тепловым шоком мембрано-ассоциированные сериновые протеиназы. Они осуществляют качественный белковый контроль, гидролизуя поврежденные белки. У многих патогенных микроорганизмов HtrA являются фактором патогенности. У млекопитающих снижение активности HtrA связано с такими тяжелыми заболеваниями, как артрит, рак, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера. Для клеток стрептококка показано участие фермента в кворум-зависимых процессах и образовании биопленки. Целью данной работы являлось оценить значение протеиназы HtrA в образовании биопленки клетками *Bacillus subtilis*. С помощью дифференциального флюоресцентного окрашивания мертвых и живых клеток и подсчета КОЕ было показано, что при температуре свыше 60 °C жизнеспособность клеток бацилл с гиперпродукцией протеиназы HtrA повышалась в 6 раз по сравнению с контрольным штаммом. Также было обнаружено различной степени роение колоний клетками *B. subtilis* с гиперпродукцией белка HtrA. Окрашиванием кристаллическим фиолетовым и конфокальной лазерной сканирующей микроскопией обнаружена способность штаммов с гиперпродукцией протеиназы образовывать более плотные биопленки. Для оценки синтеза внеклеточного матрикса, клетки выращивались на твердой питательной среде с красителем Конго Красный. Колонии клеток с повышенным содержанием характеризовались красным окрашиванием, что свидетельствовало о синтезе в матриксе амилоидов, а толщина окрашенной красителем колонии была в 1,5 раза больше, чем у исходного штамма. Чтобы установить влияние HtrA на уровень экспрессии оперонов, участвующих в синтезе внеклеточного матрикса биопленки, были получены рекомбинантные штаммы с репортерными конструкциями *eps-LacZ* и *uqxM-LacZ*. Уровень активности β -галактозидазы в прикрепленных клетках показал повышенную экспрессию *eps* оперона и гена *uqxM* и образование более плотной биопленки клетками гиперпродуцента HtrA. Предполагается, что повышенный синтез HtrA также может влиять на протеом организма, в том числе и клеток, находящихся в составе биопленки. Проверку проводили с помощью 1D и 2D электрофорезов, которые также показали различия в протеомах рекомбинантного штамма и штамма дикого типа. Таким образом, повышенный синтез протеиназы HtrA значительно повышает жизнеспособность клеток бацилл в условиях теплового стресса, способствует образованию биопленки клетками *B. subtilis* и синтезу ее внеклеточного матрикса, а также приводит к изменению протеомного профиля клеток, находящихся в составе биопленки. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (Проект №15-14-00046).