

УДК 579.22+579.24

**ГИПЕРПРОДУКЦИЯ БЕЛКА HtrA ПОВЫШАЕТ
ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК *Bacillus subtilis* В УСЛОВИЯХ
СТРЕССА И СТИМУЛИРУЕТ ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ**

Л.С. Чернова, И.С. Шарафутдинов, А.Р. Каюмов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

HtrA (High temperature requirement A) – индуцируемые тепловым шоком сериновые протеиназы. В клетках про- и эукариот эти ферменты осуществляют качественный белковый контроль путем гидролиза денатурированных белков, тем самым предохраняя клетки от последствий различных стрессов. У многих микроорганизмов они являются фактором патогенности. Для стрептококков показано участие фермента в кворум-зависимых процессах и образовании биопленки. В настоящей работе получен штамм *Bacillus subtilis* HtrA Ну с гиперпродукцией белка HtrA и охарактеризованы его физиологические особенности. Повышенное содержание HtrA привело к более высокой жизнеспособности клеток штамма *B. subtilis* HtrA Ну в условиях температурного, этанольного и солевого стрессов по сравнению с исходным. Кроме этого, полученный штамм характеризуется образованием более плотной биопленки с повышенным содержанием внеклеточного матрикса. Окраска колоний Конго красным показала, что повышенный синтез белка HtrA сопровождается также интенсивным синтезом амилоидных белков и выраженным роением клеток в колонии. Вероятно, это связано с влиянием фермента на регуляторные процессы, возможно, за счет гидролиза сигнальных регуляторных пептидов.

Ключевые слова: протеаза HtrA, образование биопленки, жизнеспособность, температурный стресс, гиперпродукция протеазы

Введение

Прокариоты имеют различные механизмы адаптации к стрессу, которые позволяют им выживать в неблагоприятных условиях окружающей среды. Так, одним из подобных инструментов, повышающих жизнеспособность клеток *Escherichia coli* в стрессовых условиях, являются DO протеазы DegP, которые осуществляют АТФ-зависимый гидролиз денатурированных белков [1]. К этому классу относятся белки HtrA – мембрано-ассоциированные сериновые протеазы, активность которых модулируется тепловым шоком [2, 3]. Эти белки могут также выступать в качестве шаперонов, стабилизируя дефектные белки [4–7]. Многие патогенные бактерии из-за нехватки HtrA могут частично или полностью потерять свою вирулентность. Это происходит из-за повышенной уязвимости бактерий к стрессам или уменьшения секреции факторов вирулентности [8]. Кроме того, снижение вирулентности мутантов по гену *htrA* может быть следствием накопления поврежденных белков в периплазматическом пространстве [9].

У млекопитающих снижение активности HtrA связано с такими тяжелыми заболеваниями, как артрит, рак, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера [10–12]. Ранее было показано, что HtrA-подобная протеаза в *Bacillus subtilis* необходима и для выживания в условиях повышенных температур [13].

В настоящей работе получен штамм *B. subtilis* с гиперпродукцией белка HtrA и показана повышенная жизнеспособность клеток этого штамма в условиях температурного, этанольного и солевого стрессов, а также повышенное образование биопленки.

1. Материалы и методы

1.1. Штаммы. В работе использовались штаммы *E. coli* XL-10 (Stratagene), *B. subtilis* 168 (дикий тип). Штамм *B. subtilis* Hy^{HtrA}, который обеспечивает гиперпродукцию белка HtrA в присутствии IPTG, получен путем трансформации клеток *B. subtilis* 168 плазмидой pDG-HtrA.

1.2. Условия культивирования. Культивирование бактерий проводили в колбах объемом 100 и 250 мл при соотношении объема среды к объему колбы 1 : 7.5 на лабораторных качалках с интенсивностью качания 200 об./мин при температуре 37 °С. Контроль за ростом культуры осуществляли, определяя изменение оптической плотности (ОП₆₀₀) культуры. За единицу биомассы принимали поглощение в кювете с толщиной слоя 1 см, равное единице.

Среда LB включает триптон – 1.0%; дрожжевой экстракт – 0.5%; NaCl – 0.5%; pH 8.5 [14]. Агаризованная среда LBA включает дополнительно 2% агара. Среда BM [15] имеет следующий состав (%): пептон – 0.7; глюкоза – 0.5; MgSO₄·7H₂O – 0.2; CaCl₂ – 0.005. При выращивании рекомбинантных штаммов в среду вносили антибиотики ампициллин – 100 мг/мл для рекомбинантных клеток *E. coli*, канамицин – 10 мг/мл для рекомбинантных клеток *B. subtilis*.

1.3. Конструирование штамма *B. subtilis* Hy^{HtrA}. Ген *htrA* амплифицировали с геномной ДНК *B. subtilis* 168, используя праймеры up AAT ATA AAG CTT CAT GTG AAA ATA GAG AAA CG и lw AAA GCC AAG CTT TTA TCA TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA CGA AGT TTT CTC TTC TTT TTG. Полученный фрагмент рестрицировали по сайту HindIII и лигировали в вектор pDG148, рестрицированный по этому же сайту. Полученной плазмидой pDG-HtrA трансформировали клетки *B. subtilis* 168 с получением рекомбинантного штамма *B. subtilis* Hy^{HtrA}.

1.4. Определение жизнеспособности клеток. Ночные культуры штаммов *B. subtilis* wt, *B. subtilis* Hy^{HtrA} засеивали в 1.5 мл свежей LB-среды до ОП₆₀₀ 0.1 и инкубировали при 37 °С, 49 °С, 55 °С или 60 °С в течение 1 ч. Затем клетки собирали центрифугированием в течение 1 мин при 12 тыс. об./мин. и проводили окрашивание флуоресцентными красителями – пропидий йодидом и акридиновым оранжевым – в 10 мкл PBS (pH 7.4, Na₂HPO₄ – 10.9 г/л; NaH₂PO₄ – 3.2 г/л; NaCl – 9 г/л, пропидий йодид 2 мкг/мл и акридиновый оранжевый 5 мкл/мл), инкубировали 3 мин и проводили микроскопирование на флуоресцентном микроскопе Zeiss Observer.A1. Соотношение жизнеспособных и мертвых клеток

подсчитывали так, как описано в работе [16]. Для определения количества КОЕ на 1 мл среды проводили серию 10-кратных разведений клеток в 0.9%-ным NaCl и высевали по 5 мкл на агаризованную питательную среду с соответствующим антибиотиком на чашки Петри. Подсчитывали КОЕ из капель, содержащих 5–10 колоний, и рассчитывали количество КОЕ на 1 мл среды.

Для создания этанольного стресса в среду культивирования вносили этанол до конечных концентраций 5% и 7.5%. Для моделирования солевого стресса в среду вносили NaCl до концентрации 1 М [16]. Среда засеивалась клетками до ОП₆₀₀ 0.1 и культивировалась в течение 24 ч при 37 °С с интенсивностью качания 200 об./мин. Влияние стресса оценивали по изменениям оптической плотности культуры.

2.5. Анализ образования биопленки. Образование биопленки определяли путем окрашивания кристаллическим фиолетовым, как описано в [17]. Продукцию внеклеточных амилоидов проверяли на агаризованной среде ВМ с красителем Конго красным (конечная концентрация 5 мг/мл). Клетки инкубировали 48 ч при 37 °С и проводили микроскопирование поперечных срезов колоний на световом микроскопе.

2. Результаты и их обсуждение

Так как основной функцией белков HtrA является обеспечение выживаемости бактерий к повышенной температуре, исследовали рост клеток *B. subtilis* wt и *B. subtilis* Hy^{HtrA}, характеризующегося гиперпродукцией белка HtrA в условиях температурного стресса. В оптимальных температурных условиях (рис. 1, а), так же как и в условиях теплового шока (49 °С, рис. 1, б), скорость роста клеток *B. subtilis* Hy^{HtrA} была выше, чем у *B. subtilis* wt. Исследовали также выживаемость клеток этих штаммов, находящихся в экспоненциальной фазе роста, после воздействия на них высокой температуры (49 °С, 55 °С, 60 °С) [18, 19]. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью дифференциального флуоресцентного окрашивания и подсчета жизнеспособных клеток (рис. 2).

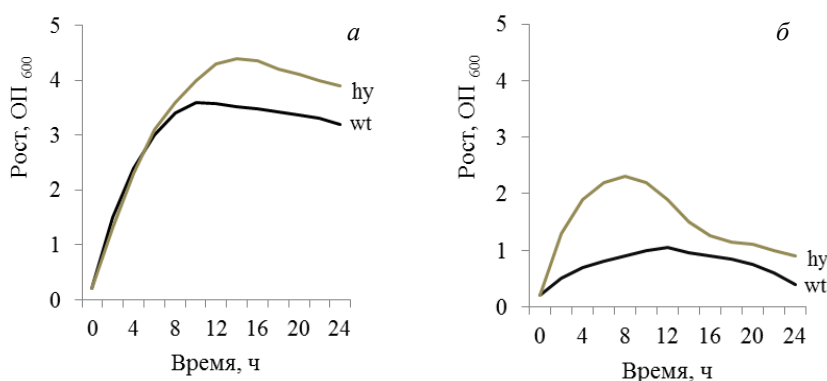


Рис. 1. Динамика роста штаммов *B. subtilis* при 37 °С (а) и при 49 °С (б). Обозначения: wt – *B. subtilis* wt, hy – *B. subtilis* Hy^{HtrA}

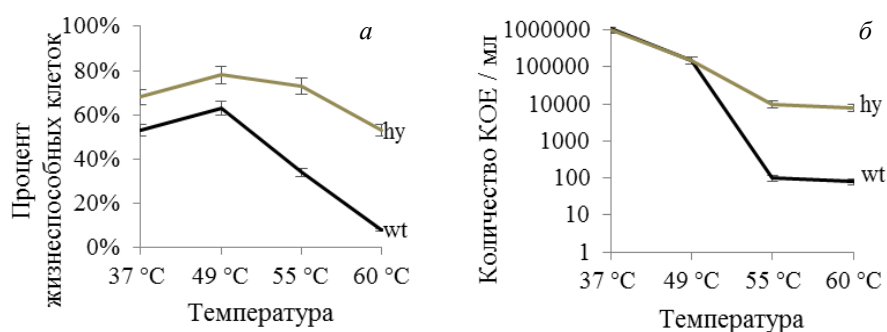


Рис. 2. Оценка жизнеспособности *B. subtilis* при культивировании в условиях температурного шока с помощью дифференциального флуоресцентного окрашивания (а) и подсчета КОЕ (б). Обозначения: wt – *B. subtilis* wt, hy – *B. subtilis* ^{HtrA}hy

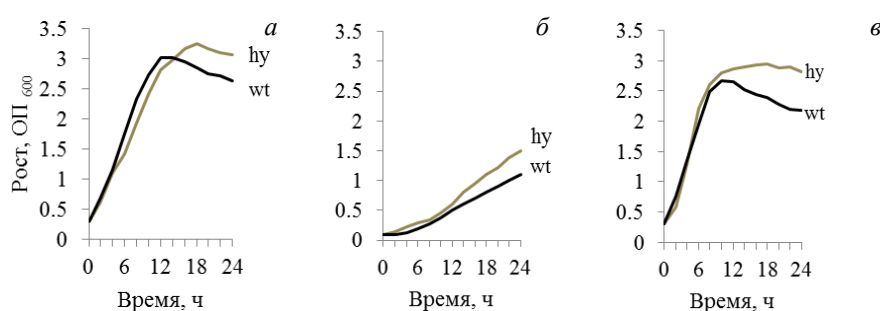


Рис. 3. Динамика роста штаммов *B. subtilis* при воздействии 5%-ным этанолом (а), 7.5%-ным этанолом (б) и 1 М NaCl (в). Обозначения: wt – *B. subtilis* wt, hy – *B. subtilis* ^{HtrA}hy

При температурах 37 °С и 49 °С количество жизнеспособных клеток штаммов *B. subtilis* wt и *B. subtilis* ^{HtrA}hy значительно не различалось. При температуре 60 °С количество жизнеспособных клеток при гиперпродукции белка составляло 53% и было в 7 раз выше, чем у контрольного штамма (рис. 1, а). Подсчет КОЕ подтвердил полученные данные (рис. 1, б). Следовательно, гиперпродукция белка HtrA повышает устойчивость клеток бактерий к температурному стрессу.

Поскольку HtrA-протеазы участвуют в преодолении клеткой не только температурного стресса [20], исследовали динамику роста клеток *B. subtilis* wt и *B. subtilis* ^{HtrA}hy в условиях этанольного (5% и 7.5% этанол) и солевого (1 М NaCl) стрессов.

В условиях этанольного и солевого стрессов клетки штамма *B. subtilis* ^{HtrA}hy также характеризовались более высокой выживаемостью (рис. 3).

Таким образом, полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными о снижении устойчивости к стрессам мутантов по протеазе HtrA [19] и могут быть использованы при создании генноинженерных штаммов с повышенной устойчивостью к температуре и химическим агентам.

Для некоторых бактерий ранее показано участие протеазы HtrA в кворум-зависимых процессах – развитии генетической компетентности, образовании факторов вирулентности, формировании биопленок [21, 22]. Кроме того выявлено, что рекомбинантная протеиназа trA *B. subtilis* уменьшает толщину биопленки

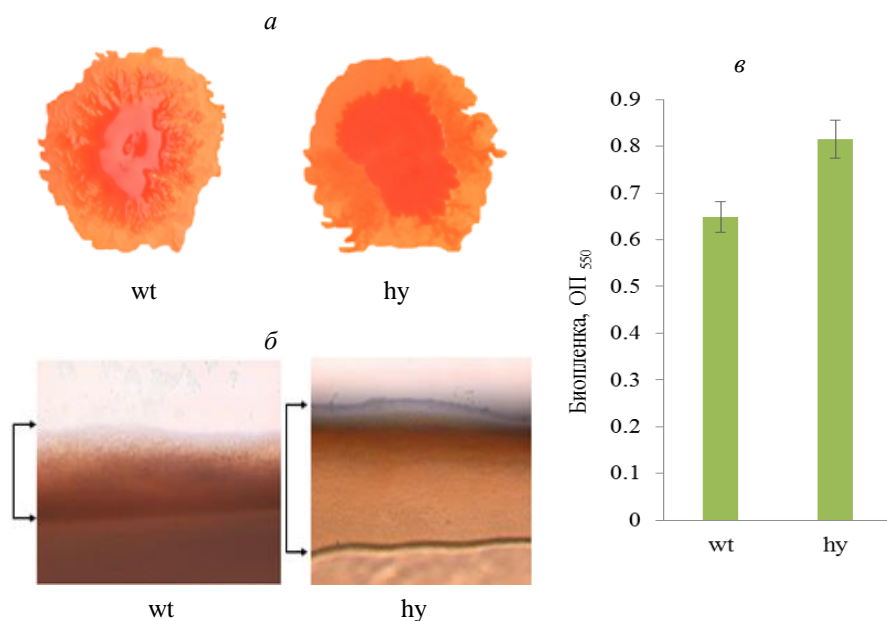


Рис. 4. Оценка интенсивности образования биопленок штаммами *B. subtilis* wt, *B. subtilis* Hy^{HtrA}: *a* – с помощью окрашивания Конго красным, *б* – поперечный срез колонии, *в* – в зависимости от оптической плотности ОП₅₅₀ по степени окрашивания кристаллическим фиолетовым. Обозначения: wt – *B. subtilis* wt, hy – *B. subtilis* Hy^{HtrA}

стафилококков [23]. В ходе наших исследований обнаружено, что колонии *B. subtilis* Hy^{HtrA} отличаются от колоний клеток дикого типа. В связи с этим нами изучена также их способность синтезировать амилоидные белки, определяющие во многом структуру колонии бактерий, при помощи окрашивания красителем Конго красным [24]. Установлено, что клетки *B. subtilis* wt и *B. subtilis* Hy^{HtrA} окрашиваются в красный цвет, что свидетельствует о синтезе амилоидных белков, образующих белковый каркас матрикса биопленки (рис. 4, *a*). Микроскопирование поперечных срезов колоний на световом микроскопе показало, что колония клеток штамма *B. subtilis* Hy^{HtrA} имеет толщину в 1.5 раза больше, чем клетки исходного штамма, и более интенсивную окраску Конго красным (рис. 4, *б*). Это позволило предположить, что повышенный синтез протеазы затрагивает процесс образования биопленки. Чтобы количественно охарактеризовать интенсивность образования биопленки штаммом *B. subtilis* Hy^{HtrA}, трехсуточные биопленки исходного штамма и штамма с гиперпродукцией белка HtrA окрашивали кристаллическим фиолетовым, связанный краситель элюировали этанолом и определяли оптическую плотность в элюатах. Результаты показали, что уровень образования биопленки штамма *B. subtilis* с повышенным синтезом белка HtrA превышал уровень контроля (рис. 4, *в*). Вероятно, это связано с влиянием фермента на регуляторные процессы, возможно, за счет гидролиза сигнальных регуляторных пептидов, как это ранее показано для *Streptococcus mutans* [25].

Таким образом, гиперпродукция протеиназы HtrA приводит к повышенной жизнеспособности клеток бацилл в условиях теплового стресса. Молекулярные механизмы повышения уровня синтеза матрикса биопленки в результате

гиперпродукции протеазы HtrA пока остаются непонятными и требуют дальнейших исследований.

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

Литература

1. Clausen T., Kaiser M., Huber R., Ehrmann M. HTRA proteases: Regulated proteolysis in protein quality control // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2011. – V. 12, No 3. – P. 152–162. – doi: 10.1038/nrm3065.
2. Skórko-Glonek J., Wawrzynów A., Krzewski K., Kurpierz K., Lipińska B. Site-directed mutagenesis of the HtrA (DegP) serine protease, whose proteolytic activity is indispensable for *Escherichia coli* survival at elevated temperatures // *Gene.* – 1995. – V. 163, No 1. – P. 47–52. – doi: 10.1016/0378-1119(95)00406-V.
3. Seol J.H., Woo S.K., Jung E.M., Yoo S.J., Lee C.S., Kim K.J., Tanaka K., Ichihara A., Ha D.B., Chung C.H. Protease Do is essential for survival of *Escherichia coli* at high temperatures: Its identity with the *htrA* gene product // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1991. – V. 176, No 2. – P. 730–736. – doi: 10.1016/S0006-291X(05)80245-1.
4. Gottesman S. Proteases and their targets in *Escherichia coli* // *Annu. Rev. Genet.* – 1996. – V. 30. – P. 465–506. – doi: 10.1146/annurev.genet.30.1.465.
5. Gottesman S., Wickner S., Maurizi M.R. Protein quality control: Triage by chaperones and proteases // *Genes Dev.* – 1997. – V. 11, No 7. – P. 815–823. – doi: 10.1101/gad.11.7.815.
6. Visick J.E., Clarke S. Repair, refold, recycle: how bacteria can deal with spontaneous and environmental damage to proteins // *Mol. Microbiol.* – 1995. – V. 16, No 6. – P. 835–845. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02311.x.
7. Krojer T., Sawa J., Schäfer E., Saibil H.R., Ehrmann M., Clausen T. Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP // *Nature.* – 2008. – V. 453, No 7197. – P. 885–890. – doi: 10.1038/nature07004.
8. Skórko-Glonek J., Zurawa-Janicka D., Koper T., Jarzab M., Figaj D., Glaza P., Lipińska B. HtrA protease family as therapeutic targets // *Curr. Pharm. Des.* – 2013. – V. 19, No 6. – P. 977–1009. – doi: 10.2174/1381612811319060003.
9. Hyyryläinen H.-L., Bolhuis A., Darmon E., Muukkonen L., Koski P., Vitikainen M., Sarvas M., Prágai Z., Bron S., van Dijk J.M., Kontinen V.P. A novel two-component regulatory system in *Bacillus subtilis* for the survival of severe secretion stress // *Mol. Microbiol.* – 2001. – V. 41, No 5. – P. 1159–1172. – doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02576.x.
10. Coleman H.R., Chan C.C., Ferris F.L. III, Chew E.Y. Age-related macular degeneration // *Lancet.* – 2008. – V. 372, No 9652. – P. 1835–1845. – doi: 10.1016/S0140-6736(08)61759-6.
11. Vande Walle L., Lamkanfi M., Vandenaabeele P. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: An overview // *Cell Death Differ.* – 2008. – V. 15, No 3. – P. 453–460. – doi: 10.1038/sj.cdd.4402291.
12. Chien J., Ota T., Aletti G., Shridhar R., Boccellino M., Quagliuolo L., Baldi A., Shridhar V. Serine protease HtrA1 associates with microtubules and inhibits cell migration // *Mol. Cell. Biol.* – 2009. – V. 29, No 15. – P. 4177–4187. – doi: 10.1128/MCB.00035-09.
13. Pallen M.J., Wren B.W. The HtrA family of serine proteases // *Mol. Microbiol.* – 1997. – V. 26, No 2. – P. 209–221. – doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.5601928.x.
14. Sambrook J.E., Fritsch F., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*: 3 v. – N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 1626 p.

15. Kayumov A.R., Khakimullina E.N., Sharafutdinov I.S., Trizna E.Y., Latypova L.Z., Lien H.T., Margulis A.B., Bogachev M.I., Kurbangalieva A.R. Inhibition of biofilm formation in *Bacillus subtilis* by new halogenated furanones // J. Antibiot. (Tokyo). – 2015. – V. 68, No 5. – P. 297–301. – doi: 10.1038/ja.2014.143.
16. Каюмов А.Р., Балабан Н.П., Марданова А.М., Костров С.В., Шарипова М.Р. Биосинтез субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* в условиях солевого стресса // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 5. – С. 642–648.
17. O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis // Mol. Microbiol. – 1998. – V.28, No 3. – P. 449–461. – doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x.
18. Noone D., Howell A., Devine K.M. Expression of *ykdA*, encoding a *Bacillus subtilis* homologue of HtrA, is heat shock inducible and negatively autoregulate // J. Bacteriol. – 2000. – V. 182, No 6. – P. 1592–1599. – doi: 10.1128/JB.182.6.1592-1599.2000.
19. Noone D., Howell A., Collery R., Devine K.M. YkdA and YvtA, HtrA-like serine proteases in *Bacillus subtilis*, engage in negative autoregulation and reciprocal cross-regulation of *ykdA* and *yvtA* gene expression // J. Bacteriol. – 2001. – V. 183, No 2. – P. 654–663. – doi: 10.1128/JB.183.2.654-663.2001.
20. Clausen T., Southan C., Ehrmann M. The HtrA family of proteases. Implications for protein composition and cell fate // Mol. Cell. – 2002. – V. 10, No 3. – P. 443–455. – doi: 10.1016/S1097-2765(02)00658-5.
21. Peterson S.N., Sung C.K., Cline R., Desai B.V., Snesrud E.C., Luo P., Walling J., Li H., Mintz M., Tsegaye G., Burr P.C., Do Y., Ahn S., Gilbert J., Fleischmann R.D., Morrison D.A. Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays // Mol. Microbiol. – 2004. – V. 51, No 4. – P. 1051–1070. – doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03907.x.
22. Sebert M.E., Palmer L.M., Rosenberg M., Weiser J.N. Microarray-based identification of *htrA*, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization // Infect. Immun. – 2002. – V. 70, No 8. – P. 4059–4067. doi: 10.1128/IAI.70.8.4059-4067.2002.
23. Sharafutdinov I., Shigapova Z., Baltin M., Akhmetov N., Bogachev M., Kayumov A. HtrA protease from *Bacillus subtilis* suppresses the bacterial fouling of the rat skin injuries // J. BioNanoSci. – 2016. – V. 6, No 4. – P. 564–567. – doi 10.1007/s12668-016-0281-2.
24. Romero D., Aguilar C., Losick R., Kolter R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2010. – V. 107, No 5. – P. 2230–2234. – doi: 10.1073/pnas.0910560107.
25. Biswas S., Biswas I. Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by *Streptococcus mutans* // Infect. Immun. – 2005. – V. 73, No 10. – P. 6923–6934. – doi: 10.1128/IAI.73.10.6923-6934.2005.

Поступила в редакцию
14.12.16

Чернова Лилия Сергеевна, лаборант-исследователь НИЛ «Молекулярная генетика микроорганизмов»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: lsch-888@live.com

Шарафутдинов Иршад Султанович, младший научный сотрудник НИЛ «Молекулярная генетика микроорганизмов»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: irwad@yandex.ru

Каюмов Айрат Рашитович, кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: kairatr@yandex.ru

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2017, vol. 159, no. 2, pp. 262–271

HtrA Protein Hyperproduction Increases the Viability of *Bacillus subtilis* Cells under the Stress Conditions and Stimulates Biofilm Formation

L.S. Chernova^{*}, I.S. Sharafutdinov^{**}, A.R. Kayumov^{***}

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: ^{*}lsch-888@live.com, ^{**}irwad@yandex.ru, ^{***}kairatr@yandex.ru

Received December 14, 2016

Abstract

HtrA (high-temperature requirement A) are the heat shock-induced serine proteases widely spread in pro- and eukaryotic cells. These enzymes control the quality of intracellular proteins by hydrolysis of denatured proteins, thereby protecting cells from various stresses. In many pathogenic bacteria, they are factors of pathogenicity. Thus, in *Streptococcus mutans*, HtrA participates in quorum-dependent processes and biofilm formation via digestion of the pheromone ComX. In this work, *Bacillus subtilis* HtrA Hy with an overexpression of the HtrA protein has been obtained and its physiological features have been characterized. The overexpression of HtrA in *Bacillus subtilis* cells increases cell viability at high temperature conditions, ethanol and salt stresses. In addition, *B. subtilis* HtrA Hy is characterized by the intensive biofilm formation with an increased synthesis of extracellular matrix. Congo red staining of the co lony has revealed that HtrA overexpression induces the increased production of amyloid-like proteins. Moreover, these cells exhibited intensive swarming in contrast to the wild-type strain. The overexpression of the HtrA protease results in an increased level of expression of the *eps* and *yqxM* genes encoding the components of the biofilm matrix. This fact is probably related to the effect of the enzyme on regulatory processes, possibly due to the hydrolysis of signal regulatory peptides.

Keywords: protease HtrA, biofilm formation, viability, temperature stress, protease hyperproduction

Acknowledgments. The study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 15-14-00046).

Figure Captions

- Fig. 1. The dynamics of growth of *B. subtilis* strains at 37 °C (a) and at 49 °C (b). Key: wt – *B. subtilis* wt, hy – *B. subtilis* Hy^{HtrA}.
- Fig. 2. Assessment of the viability in *B. subtilis* cultivated under the conditions of temperature shock using differential fluorescent staining (a) and CFU counting (b). Key: wt – *B. subtilis* wt, hy – *B. subtilis* Hy^{HtrA}.
- Fig. 3. The dynamics of growth of *B. subtilis* strains after 5% (a) and 7.5% (b) ethanol exposure and 1 M NaCl (c). Key: wt – *B. subtilis* wt, hy – *B. subtilis* Hy^{HtrA}.

Fig. 4. Quantification of biofilm formation by *B. subtilis* wt, *B. subtilis* Hy^{HtrA}: *a* – with the help of Congo red staining, *b* – a cross section of the colony, *c* – depending on the optical density OD₅₅₀ by crystal violet staining intensity. Key: wt – *B. subtilis* wt, hy – *B. subtilis* Hy^{HtrA}.

References

1. Clausen T., Kaiser M., Huber R., Ehrmann M. HTRA proteases: Regulated proteolysis in protein quality control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2011, vol. 12, no. 3, pp. 152–162. doi: 10.1038/nrm3065.
2. Skórko-Głonek J., Wawrzynów A., Krzewski K., Kurpierz K., Lipińska B. Site-directed mutagenesis of the HtrA (DegP) serine protease, whose proteolytic activity is indispensable for *Escherichia coli* survival at elevated temperatures. *Gene*, 1995, vol. 163, no. 1, pp. 47–52. doi: 10.1016/0378-1119(95)00406-V.
3. Seol J.H., Woo S.K., Jung E.M., Yoo S.J., Lee C.S., Kim K.J., Tanaka K., Ichihara A., Ha D.B., Chung C.H. Protease Do is essential for survival of *Escherichia coli* at high temperatures: Its identity with the *htrA* gene product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, vol. 176, no. 2, pp. 730–736. doi: 10.1016/S0006-291X(05)80245-1.
4. Gottesman S. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.*, 1996, vol. 30, pp. 465–506. doi: 10.1146/annurev.genet.30.1.465.
5. Gottesman S., Wickner S., Maurizi M.R. Protein quality control: Triage by chaperones and proteases. *Genes Dev.*, 1997, vol. 11, no. 7, pp. 815–823. doi: 10.1101/gad.11.7.815.
6. Visick J.E., Clarke S. Repair, refold, recycle: How bacteria can deal with spontaneous and environmental damage to proteins. *Mol. Microbiol.*, 1995, vol. 16, no. 6, pp. 835–845. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02311.x.
7. Krojer T., Sawa J., Schäfer E., Saibil H.R., Ehrmann M., Clausen T. Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature*, 2008, vol. 453, no. 7197, pp. 885–890. doi: 10.1038/nature07004.
8. Skórko-Głonek J., Zurawa-Janicka D., Koper T., Jarzab M., Figaj D., Glaza P., Lipińska B. HtrA protease family as therapeutic targets. *Curr. Pharm. Des.*, 2013, vol. 19, no. 6, pp. 977–1009. doi: 10.2174/1381612811319060003.
9. Hyyryläinen H.-L., Bolhuis A., Darmon E., Muukkonen L., Koski P., Vitikainen M., Sarvas M., Prágai Z., Bron S., van Dijk J.M., Kontinen V.P. A novel two-component regulatory system in *Bacillus subtilis* for the survival of severe secretion stress. *Mol. Microbiol.*, 2001, vol. 41, no. 5, pp. 1159–1172. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02576.x.
10. Coleman H.R., Chan C.C., Ferris F.L. III, Chew E.Y. Age-related macular degeneration. *Lancet*, 2008, vol. 372, no. 9652, pp. 1835–1845. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61759-6.
11. Vande Walle L., Lamkanfi M., Vandenaabeele P. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: An overview. *Cell Death Differ.*, 2008, vol. 15, no. 3, pp. 453–460. doi: 10.1038/sj.cdd.4402291.
12. Chien J., Ota T., Aletti G., Shridhar R., Boccellino M., Quagliuolo L., Baldi A., Shridhar V. Serine protease HtrA1 associates with microtubules and inhibits cell migration. *Mol. Cell Biol.*, 2009, vol. 29, no. 15, pp. 4177–4187. doi: 10.1128/MCB.00035-09.
13. Pallen M.J., Wren B.W. The HtrA family of serine proteases. *Mol. Microbiol.*, 1997, vol. 26, no. 2, pp. 209–221. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.5601928.x.
14. Sambrook J.E., Fritsch F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: 3 vols. New York, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
15. Kayumov A.R., Khakimullina E.N., Sharafutdinov I.S., Trizna E.Y., Latypova L.Z., Lien H.T., Margulis A.B., Bogachev M.I., Kurbangalieva A.R. Inhibition of biofilm formation in *Bacillus subtilis* by new halogenated furanones. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 2015, vol. 68, no. 5, pp. 297–301. doi: 10.1038/ja.2014.143.
16. Kayumov A.R., Balaban N.P., Mardanova A.M., Kostrov S.V., Sharipova M.R. Biosynthesis of the subtilisin-like serine proteinase of *Bacillus intermedius* under salt stress conditions. *Microbiology*, 2006, vol. 75, no. 5, pp. 557–562. doi: 10.1134/S0026261706050043.

17. O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Mol. Microbiol.*, 1998, vol. 28, no. 3, pp. 449–461. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x.
18. Noone D., Howell A., Devine K.M. Expression of *ykfA*, encoding a *Bacillus subtilis* homologue of HtrA, is heat shock inducible and negatively autoregulate. *J. Bacteriol.*, 2000, vol. 182, no. 6, pp. 1592–1599. doi: 10.1128/JB.182.6.1592-1599.2000.
19. Noone D., Howell A., Collery R., Devine K.M. YkdA and YvtA, HtrA-like serine proteases in *Bacillus subtilis*, engage in negative autoregulation and reciprocal cross-regulation of *ykfA* and *yvtA* gene expression. *J. Bacteriol.*, 2001, vol. 183, no. 2, pp. 654–663. doi: 10.1128/JB.183.2.654-663.2001.
20. Clausen T., Southan C., Ehrmann M. The HtrA family of proteases. Implications for protein composition and cell fate. *Mol. Cell.*, 2002, vol. 10, no. 3, pp. 443–455. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00658-5.
21. Peterson S.N., Sung C.K., Cline R., Desai B.V., Snesrud E.C., Luo P., Walling J., Li H., Mintz M., Tsegaye G., Burr P.C., Do Y., Ahn S., Gilbert J., Fleischmann R.D., Morrison D.A. Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Mol. Microbiol.*, 2004, vol. 51, no. 4, pp. 1051–1070. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03907.x.
22. Sebert M.E., Palmer L.M., Rosenberg M., Weiser J.N. Microarray-based identification of *htrA*, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization. *Infect. Immun.*, 2002, vol. 70, no. 8, pp. 4059–4067. doi: 10.1128/IAI.70.8.4059-4067.2002.
23. Sharafutdinov I., Shigapova Z., Baltin M., Akhmetov N., Bogachev M., Kayumov A. HtrA protease from *Bacillus subtilis* suppresses the bacterial fouling of the rat skin injuries. *J. BioNanoSci.*, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 564–567. doi 10.1007/s12668-016-0281-2.
24. Romero D., Aguilar C., Losick R., Kolter R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, vol. 107, no. 5, pp. 2230–2234. doi: 10.1073/pnas.0910560107.
25. Biswas S., Biswas I. Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, no. 10, pp. 6923–6934. doi: 10.1128/IAI.73.10.6923-6934.2005.

Для цитирования: Чернова Л.С., Шарафутдинов И.С., Каюмов А.Р. Гиперпродукция белка HtrA повышает выживаемость клеток *Bacillus subtilis* в условиях стресса и стимулирует формирование биопленки // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2017. – Т. 159, кн. 2. – С. 262–271.

For citation: Chernova L.S., Sharafutdinov I.S., Kayumov A.R. HtrA protein hyperproduction increases the viability of *Bacillus subtilis* cells under the stress conditions and stimulates biofilm formation. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2017, vol. 159, no. 2, pp. 262–271. (In Russian)