

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-86-90

УДК 616.98:579.842.23

Е.А. Красильникова, Р.З. Шайхутдинова, Т.Э. Светоч, М.Е. Платонов, Т.И. Комбарова,
С.А. Иванов, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов**ВИРУЛЕНТНОСТЬ HtpG⁺ И HtpG⁻ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ДЛЯ МЫШЕЙ
И МОРСКИХ СВИНОК**

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk, Российская Федерация

HtpG (высокотемпературный белок G – high-temperature protein G) – бактериальный гомолог высококонсервативного молекулярного шаперона Hsp90 эукариот, играющего важную роль в защите от стресса у многих бактерий. Роль продукта гена *htpG*, кодирующего синтез высокотемпературного белка G прокариот, в патогенезе бактериальных инфекций до настоящего времени остается не ясной. **Цель работы** – изучить функциональную важность HtpG в патогенезе чумы. **Материалы и методы.** Аминокислотную последовательность HtpG анализировали с использованием программы BLAST. С помощью сайт-направленного мутагенеза гена *htpG* (YPO3119) получили изогенные наборы на основе аттенуированного и вирулентных штаммов *Yersinia pestis*. Свойства полученных мутантов оценивали с использованием микробиологических и биологических методик. **Результаты и обсуждение.** Проведенный биоинформационный анализ показал высокую консервативность белка HtpG внутри вида *Y. pestis* (100 % идентичности), а также 99 % идентичности с белком *Y. pseudotuberculosis* и 96 % идентичности с белком *Y. enterocolitica*. Штамм *Y. pestis* с делецией *htpG* проявлял чувствительность к температурному и оксидативному стрессу, обладая фенотипом, общим для *htpG* мутантов других бактериальных видов. Однако мутант не был чувствителен к осмотическому стрессу и комплементу сыворотки крови человека. Утрата чумным микробом способности к синтезу HtpG не оказывала влияния на вирулентность и средние сроки жизни мышей и морских свинок при подкожном способе заражения, что свидетельствует о неперспективности его использования в качестве молекулярной мишени для терапии и/или вакцинопрофилактики чумы.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, Hsp90, HtpG, вирулентность.

Корреспондирующий автор: Красильникова Екатерина Александровна, e-mail: ek.al.krasilnikova@gmail.com.

Для цитирования: Красильникова Е.А., Шайхутдинова Р.З., Светоч Т.Э., Платонов М.Е., Комбарова Т.И., Иванов С.А., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Вирулентность HtpG⁺ и HtpG⁻ штаммов *Yersinia pestis* для мышей и морских свинок. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:86–90. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-86-90

Поступила 05.03.20. Принята к публ. 20.03.20.

Е.А. Krasil'nikova, R.Z. Shaikhutdinova, T.E. Svetoch, M.E. Platonov, T.I. Kombarova,
S.A. Ivanov, S.V. Dentovskaya, A.P. Anisimov**Virulence of HtpG⁺ and HtpG⁻ Strains of *Yersinia pestis* for Mice and Guinea Pigs**

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Abstract. HtpG (high-temperature protein G) is a bacterial homologue of the highly conserved molecular chaperone Hsp90 of eukaryotes, which plays an important role in protection against stress in many bacterial species. The role of the *htpG* gene encoding the synthesis of high-temperature prokaryotic G protein in the pathogenesis of bacterial infections is still unclear. **The aim of this work** is to study the functional importance of HtpG in the pathogenesis of plague. **Materials and methods.** Isogenic *Yersinia pestis* sets based on attenuated and virulent strains differing in the presence of the functional *htpG* gene (YPO3119) were generated with the help of site-directed mutagenesis. The HtpG amino acid sequence was analyzed using the BLAST program. The properties of the resulting mutant strains were evaluated using microbiological and biological methods. **Results and discussion.** The bioinformatics analysis showed high conservativeness of the HtpG protein within the *Y. pestis* species (100% identity), as well as 99 % identity with the *Y. pseudotuberculosis* protein and 96 % identity with the *Y. enterocolitica* protein. *Y. pestis htpG* knock-out mutants showed increase of susceptibility to temperature and oxidative stress like mutants of the other bacterial species. However, the mutant was not sensitive to osmotic stress and human serum complement. The loss of the ability to synthesize HtpG by plague microbe did not affect the virulence and average life duration of mice and guinea pigs challenged subcutaneously. It means that *htpG* gene is not a good molecular target for the treatment and/or immunoprophylaxis of plague.

Key words: *Yersinia pestis*, Hsp90, HtpG, virulence.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Ekaterina A. Krasil'nikova, e-mail: ek.al.krasilnikova@gmail.com.

Citation: Krasil'nikova E.A., Shaikhutdinova R.Z., Svetoch T.E., Platonov M.E., Kombarova T.I., Ivanov S.A., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Virulence of HtpG⁺ and HtpG⁻ strains of *Yersinia pestis* for mice and Guinea Pigs. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 2:86–90. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-86-90

Received 05.03.20. Accepted 20.03.20.

Krasil'nikova E.A., ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5472-8724>
Shaikhutdinova R.Z., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6985-6822>
Svetoch T.E., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3540-1176>
Platonov M.E., ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3946-1755>
Kombarova T.I., ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1959-1739>
Ivanov S.A., ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1180-2618>
Dentovskaya S.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1996-8949>
Anisimov A.P., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5499-7999>

Hsp90 (heat shock protein 90 – hsp90) – молекулярный шаперон, необходимый для поддержания, активации, стабилизации или созревания белков, его экспрессия усиливается при повышении температуры или других стрессирующих клетку условиях окружающей среды. Hsp90 обладает АТФ-азной активностью и вовлечен в различные клеточные процессы, в том числе фолдинг белков, передачу сигналов и пролиферацию клеток [1]. Установлено, что *hspG* прокариот кодирует гомолог белка теплового шока 90 эукариот [2]. Выявлено, что гены, кодирующие белки теплового шока, индуцируются на поздних стадиях течения инфекционного процесса, что отражает роль кодируемых продуктов в защите бактерий от стрессовых факторов и защитных механизмов, а именно оксидативного стресса, кислого pH, дефензинов или бактерицидной активности сыворотки [3], устойчивость к которым необходима патогенному микроорганизму для выживания в организме хозяина. Hsp90 эукариот – белок, необходимый для жизнеспособности клеток [4], а также играющий множество функций в фолдинге белков наряду с растущим числом кошаперонов [1]. С другой стороны, у бактерий утрата HtpG может не оказывать губительного влияния на клетку. HtpG⁻ фенотип может варьироваться от небольших дефектов в росте культуры при повышенной температуре и/или устойчивости к холодному шоку до чувствительности к оксидативному стрессу [5–7]. Установлено, что HtpG необходим для продукции ряда факторов патогенности *Escherichia coli* [8], персистенции *Salmonella typhimurium* в кишечнике свиней [9], а также играет важную роль в патогенезе инфекций, вызываемых *Francisella tularensis* [10], *Leptospira interrogans* [11] и *Edwardsiella tarda* [6].

Цель работы – изучить функциональную важность HtpG в патогенезе чумы.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. Используемые в работе штаммы *Y. pestis* представлены в табл. 1. Бактерии выращивали на питательной среде на основе сердечно-мозговой вытяжки (ВНИ), pH 7,2

или pH 5,8. ВНИ агар с 5 % сахарозы использовали для селекции двойных рекомбинантов *Y. pestis*, полученных с помощью гибридных плазмид на основе суицидного вектора pCVD442 [12]. В случае необходимости в питательные среды добавляли антибиотики: ампициллин – 100 мкг/мл, канамицин – 40 мкг/мл, хлорамфеникол – 10 мкг/мл, полимиксин В – 100 мкг/мл.

Биоинформационный анализ HtpG. Аминокислотную последовательность HtpG анализировали с использованием программы BLAST на сайте NCBI. Молекулярную массу белка и теоретическую изоэлектрическую точку (pI) определили, используя блок EditSeq программного обеспечения DNASTAR (Madison, WI, USA).

Мутагенез. Нокаутные мутанты получали с помощью технологии одноэтапной инактивации хромосомных генов [13] или плазмид на основе суицидного вектора pCVD442 [12]. Верификацию замены генов проводили с помощью полимеразой цепной реакции.

Динамику роста штаммов оценивали при выращивании в трех повторах в 200 мкл жидкой питательной среды (бульон Хоттингера с добавлением 1 % гемолизированной крови) в 96-луночных планшетах Costar (Corning Incorporated USA) в термостатируемом планшетном фотометре Multiskan FC (Thermo Scientific, USA). Для определения чувствительности штаммов к высокому содержанию соли в жидкую питательную среду добавляли хлорид натрия до 4 %. Посевная доза составляла 10⁷ КОЕ/мл. Бактериальные суспензии культивировали в течение 24 ч при температурах 28 и 37 °С. Оптическую плотность суспензии определяли при длине волны 620 нм.

Выживание в присутствии H₂O₂ и «кислого» pH. Перекись водорода серийно разводили в минимальной среде (M9) до концентрации 200 mM, 40,0 mM, 8,0 mM и 1,6 mM. Для определения чувствительности к pH готовили среду M9 с pH 3,5 и pH 7,0 в качестве контроля. В среду добавляли 10⁷ КОЕ/мл исследуемого штамма и исходного штамма, бактериальные суспензии инкубировали

Таблица 1 / Table 1

Вирулентность экспериментальных штаммов *Y. pestis* при подкожном заражении беспородных мышей
Virulence of *Y. pestis* experimental strains in subcutaneously infected outbred mice

Штаммы <i>Y. pestis</i> <i>Y. pestis</i> strains	Характеристика Description	LD ₅₀ [*] КОЕ* LD ₅₀ [*] CFU*	Средние сроки жизни, сут Mean time to death, days
231	Fra ⁺ Ymt ⁺ Lcr ⁺ HtpG ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ **	1 (1÷2)	5,4 ± 0,5
231Δ <i>hspG</i>	Fra ⁺ Ymt ⁺ Lcr ⁺ HtpG ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺	5 (1 ÷ 18)	4,4 ± 1,0
И-3189	Fra ⁺ Ymt ⁺ Lcr ⁺ HtpG ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺	2 (1 ÷ 5)	4,7 ± 0,9
И-3189Δ <i>hspG</i>	Fra ⁺ Ymt ⁺ Lcr ⁺ HtpG ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺	5 (1 ÷ 18)	5,7 ± 1,9

* 95 % доверительный интервал представлен в круглых скобках.

** способность к продукции: Fra – капсульного антигена, Ymt – мышинового токсина, Lcr – Yop белков и V антигена, HtpG, Pla – активатора плазминогена; Pgm – сочетанная способность к сорбции гемина и чувствительность к пестицину.

* 95 % confidence interval is shown in parentheses.

** ability to produce: capsular antigen Fra, Yersinia mouse toxin Ymt, LCR – Yop proteins and LcrV, HtpG, plasminogen activator Pla; Pgm – combined ability to gemin sorption and sensitivity to Pst.

при температуре 28 °С 10 мин в присутствии H₂O₂, а также 30 и 60 мин – при разных значениях pH. Выживание оценивали путем высевов разведений культур на чашки с агаром Хоттингера с 1 % гемолизированной кровью.

Оценку вирулентности проводили на 6–8-недельных самках нелинейных мышей породы Swiss Webster и морских свинок (275±25) г. Все протоколы экспериментов с животными одобрены Комитетом по биоэтике ГНЦ ПМБ, все работы проводили в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Мышей заражали подкожно десятикратными разведениями 28-градусных двухсуточных культур *Y. pestis* в изотоническом растворе NaCl в объеме 0,1 мл на пять животных. По шесть морских свинок заражали подкожно разведениями 10² и 10⁶ КОЕ 28-градусных двухсуточных культур *Y. pestis* в изотоническом растворе NaCl в объеме 0,5 мл на животное. Наблюдение за зараженными животными проводили в течение 21 сут. Погибших животных вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. Вычисление величин LD₅₀ проводили по методу Kärber в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева.

Определение чувствительности штаммов к бактерицидному действию комплемента проводили путем сравнительной оценки воздействия нормальной человеческой сыворотки и сыворотки с инактивированным путем нагревания комплементом (тНЧС) на бактериальную взвесь исследуемых штаммов с концентрацией 10⁷ КОЕ/мл по методу M.G. Barnes *et al.* [14].

Статистический анализ. Данные представляли как среднее значение ± стандартное отклонение. Для статистического анализа использовали Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software, La Jolla, CA), выполняя однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Различия считали достоверными, если p≤0,05.

Результаты и обсуждение

Биоинформационный анализ *htpG*. Открытая рамка считывания *htpG* (YPO3119 у *Y. pestis* CO92) длиной 1869 п.о. кодирует белок HtpG, состоящий из 622 аминокислотных остатков. HtpG *Y. pestis* предположительно имеет молекулярную массу 70,8 кДа и

pI = 5,03. Внутри вида *Y. pestis* белок высоко консервативен – BLASTp показал 100 % гомологию у штаммов различных биоваров чумного микроба. Гомология с белком HtpG энтеропатогенных иерсиний составила 99 % для *Y. pseudotuberculosis* (WP_106464413.1) и 96 % для *Y. enterocolitica* (WP_072089333.1). Кроме того, BLASTp анализ HtpG выявил, что белок обладает значительным подобием с остальными HtpG и Hsp90 белками. Предположительно, АТФ-азный домен локализован на N-конце белка, где присутствуют 14 консервативных остатков, необходимых для связывания АТФ (E34, N38, D41, L78, D80, G82, G84, M85, G124, V125, G126, F127, V139, T141), в том числе два G-X-G мотива (82GIG84 и 124GVG126) [6, 15]. Кроме того, HtpG *Y. pestis* структурно гомологичен C-концевому региону белков семейства HtpG (остатки 186–622).

Эффект делеции *htpG* на рост мутантного штамма, устойчивость к окислительному и осмотическому стрессу. Проведенный сайт-направленный мутагенез гена *htpG* в вакцинном штамме EV НИИЭГ, а также в вирулентных штаммах *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 и *Y. pestis* bv. Ulegeica И-3189 позволил получить мутанты EVΔ*htpG*, 231Δ*htpG*, И-3189Δ*htpG*.

HtpG – высококонсервативный молекулярный шаперон, обнаруживаемый у всех бактерий и участвующий в фолдинге белков в условиях стресса [16]. Утрата белка может оказывать различные эффекты на бактериальные клетки, в том числе приводить к дефектам роста при высоких температурах и повышению чувствительности к окислительному стрессу [6, 7, 17]. Для определения потенциальной функции HtpG в ходе повышения температуры культивирования, окислительного и осмотического стресса определили рост и выживание мутантных штаммов в данных условиях. Согласно полученным результатам при температуре культивирования 28 °С профиль роста исходного и мутантного штаммов совпадали. Повышение температуры выращивания до 37 °С приводило к запаздыванию скорости роста мутантного штамма в позднюю логарифмическую и стационарную фазы по сравнению с исходным (рис. 1, А).

Осмотический стресс является одним из условий, к которым бактерии должны адаптироваться в ходе инфекционного процесса. Установлено, что

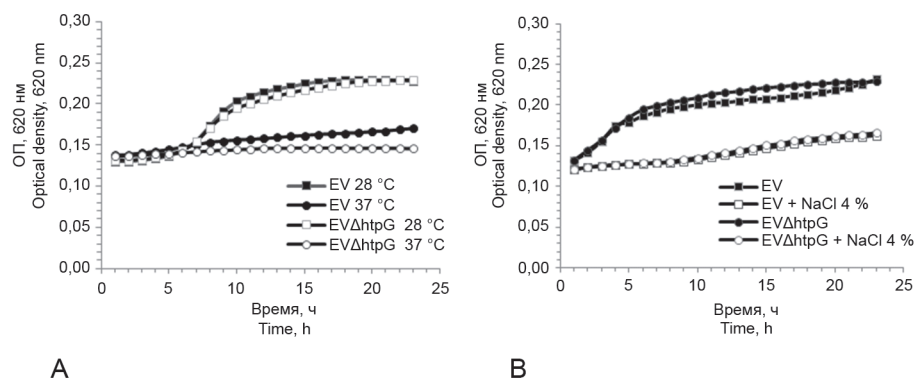


Рис. 1. Рост штамма «дикого» типа и мутанта EVΔ*htpG* *in vitro*:

А – при температурах 28 и 37 °С; В – в условиях нормальной (0,5 % NaCl) и повышенной (4 % NaCl) осмолярности

Fig. 1. Growth of the “wild” type strain and EVΔ*htpG* mutant *in vitro*:

А – cultivation at 28 °C and 37 °C; В – cultivation under normal (0.5 % NaCl) and increased (4 % NaCl) osmolarity conditions

Таблица 2 / Table 2

Чувствительность экспериментальных штаммов к перекиси водорода и рН
Sensitivity of experimental strains to hydrogen peroxide and pH

Штамм Strain	Число живых бактерий (lg КОЕ/мл) после 1 ч инкубации в H ₂ O ₂ The number of living bacteria (lg CFU/ml) after 1 h of incubation in H ₂ O ₂				Число живых бактерий (lg КОЕ/мл) после инкубации при рН The number of living bacteria (lg CFU/ml) after incubation at pH		
	40 mM	8 mM	1,6 mM	0 mM	7	3,5 (30 мин) (30 min)	3,5 (60 мин) (60 min)
EV	7,573	7,827	7,840	7,955	7,955	7,733	7,470
EVΔhtpG	6,746	7,662	7,681	7,816	7,816	7,595	7,294

экспрессия молекулярных шаперонов, отвечающих за синтез белков теплового шока, растет при осмотическом шоке [17].

Исходный и мутантный штаммы выращивали в условиях нормальной (0,5 % NaCl) и повышенной осмолярности (4 % NaCl). Различий в скорости роста при 4 % NaCl в среде культивирования не наблюдали, что говорит об отсутствии чувствительности мутантного штамма к осмотическому стрессу (рис. 1, Б).

При анализе выживания в присутствии H₂O₂ (40 mM) установили снижение жизнеспособности мутантного штамма EVΔhtpG (86,3 %) по сравнению с исходным штаммом EV (95,2 %) (p<0,001). Число бактерий исходного и мутантного штаммов, переживших инкубацию в среде при pH 3,5, не отличалось (табл. 2).

Устойчивость к сыворотке. Система комплемента является одним из ключевых факторов врожденного иммунитета хозяина. Ранее мы показали, что штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis* устойчивы к действию комплемента [18]. Согласно полученным результатам клетки исходного штамма *Y. pestis* 231, выращенные при температуре 25 °С, переживали действие комплемента 80 % нормальной человеческой сыворотки (НЧС). Инкубация в течение 1 ч в 80 % НЧС штамма 231 с делетированным геном *htpG* также не приводила к достоверному снижению числа жизнеспособных микробных клеток (lg 6,24±0,56 КОЕ) по сравнению с инкубацией в тНЧС (lg 6,5±0,15 КОЕ).

Эффект делеции на вирулентность для мышей и морских свинок при подкожном заражении. Сравнительная оценка вирулентности исследуемых штаммов *Y. pestis* для беспородных мышей при подкожном способе заражения не выявила достоверных различий в величинах LD₅₀ штаммов «дикого» типа, а также всех сконструированных нами HtpG⁻ вариантов (табл. 1). Средние сроки жизни мышей, погиб-

ших в результате заражения штаммами 231 и И-3189 или их изогенными производными, достоверно не отличались (рис. 2, табл. 1).

Выживаемость морских свинок после подкожного введения 10² КОЕ тестируемых культур чумного микроба составила 66 % для исходного штамма *Y. pestis* 231 против 50 % у его делеционного мутанта и 33 % для исходного штамма *Y. pestis* И-3189 против 50 % у его делеционного мутанта. При введении 10⁶ КОЕ всех исходных и мутантных штаммов не выжила ни одна морская свинка.

Взаимосвязь между HtpG и патогенностью бактерий остается в большей степени не охарактеризованной. У прокариот гомологи HtpG идентифицировали у большого числа бактериальных видов и, в противоположность белку Hsp90 эукариот, делеция *htpG* не всегда ассоциирована с летальностью [19, 20]. У *E. coli* и *Actinobacillus actinomycetemcomitans* делеция *htpG* ведет к появлению дефектов роста при повышенных, но не при низких температурах [21, 22], при этом у цианобактерий мутация в гене *htpG* ведет к снижению устойчивости к изменению температуры культивирования [7, 23, 24]. В нашем исследовании мы обнаружили, что, по сравнению со штаммом «дикого» типа, мутант проявлял незначительное снижение скорости роста в позднюю логарифмическую и стационарную фазу, а его способность переживать и расти в присутствии 40 mM H₂O₂ была снижена, подтверждая, что у чумного микроба HtpG вовлечен в преодоление стрессовых состояний, вызванных воздействием активных форм кислорода и высокой температуры. При этом Δ*htpG*-мутант чумного микроба был также устойчив к действию комплемента нормальной человеческой сыворотки, как и исходный штамм. Ясно, что столь незначительное снижение устойчивости чумного микроба к условиям стресса не могло существенно отразиться

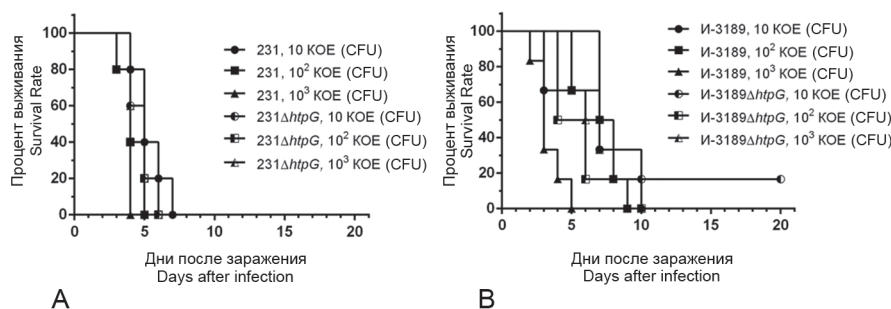


Рис. 2. Выживаемость беспородных мышей после подкожного заражения экспериментальными штаммами:

A – *Y. pestis* 231 и 231Δ*htpG*; **B** – *Y. pestis* И-3189 и И-3189Δ*htpG*

Fig. 2. Survival rate of outbred mice following subcutaneous injection of experimental strains:

A – *Y. pestis* 231 and 231Δ*htpG*; **B** – *Y. pestis* И-3189 and И-3189Δ*htpG*

на вирулентности делеционных мутантов. В отличие от $\Delta htpG$ -мутантов *Salmonella typhimurium* [9], *L. interrogans* [11] и *E. tarda* [6] делеция гена *htpG* не ведет к аттенуации штаммов чумного микроба при подкожном введении беспородным мышам и морским свинкам.

Таким образом, утрата способности продуцировать HtpG не влияет на вирулентность $\Delta htpG$ мутантов *Y. pestis* для мышей и морских свинок, что свидетельствует об отсутствии перспективности его использования в качестве молекулярной мишени для терапии и/или вакцинопрофилактики чумы.

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016–2020 гг.: «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями».

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

References / Список литературы

1. Wandinger S.K., Richter K., Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 2008; 283:18473–7. DOI: 10.1074/jbc.R800007200.
2. Bardwell, J.C., Craig, E.A. Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987; 84(15):5177–88. DOI: 10.1073/pnas.84.15.5177.
3. Guisbert E., Yura T., Rhodius V.A., Gross C.A. Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the *Escherichia coli* heat shock response. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 2008; 72(3):545–54. DOI: 10.1128/MMBR.00007-08.
4. Frydman J. Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 2001; 70:603–48. DOI: 10.1146/annurev.biochem.70.1.603.
5. Choi S., Jang K., Yun H.-J., Kang D.-H. Identification of the *Vibrio vulnificus htpG* gene and its influence on cold shock recovery. *J. Microbiol.* 2012; 50:707–11. DOI: 10.1007/s12275-012-2294-z.
6. Dang W., Hu Y.-H., Sun L. HtpG is involved in the pathogenesis of *Edwardsiella tarda*. *Vet. Microbiol.* 2011; 152(3–4):394–400. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.05.030.
7. Tanaka N., Nakamoto H. HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria. *FEBS Lett.* 1999; 458(2):117–23. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)01134-5.
8. Garcie C., Tronnet S., Garénaux A., McCarthy A.J., Brachmann A.O., Pénary M., Houle S., Nougayrède J.P., Piel J., Taylor P.W., Dozois C.M., Genevoux P., Oswald E., Martin P. The bacterial stress-responsive Hsp90 chaperone (HtpG) is required for the production of the genotoxin colibactin and the siderophore yersiniabactin in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 2016; 214(6):916–24. DOI: 10.1093/infdis/jiw294.
9. Verbrugghe E., Van Parys A., Leyman B., Boyen F., Haesebrouck F., Pasmans F. HtpG contributes to *Salmonella typhimurium* intestinal persistence in pigs. *Vet. Res.* 2015; 46(1):118. DOI: 10.1186/s13567-015-0261-5.
10. Weiss D.S., Brotcke A., Henry T., Margolis J.J., Chan K., Monack D.M. *In vivo* negative selection screen identifies genes required for *Francisella virulence*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104(14):6037–42. DOI: 10.1073/pnas.0609675104.
11. King A.M., Bartpho T., Sermswan R.W., Bulach D.M., Eshghi A., Picardeau M., Adler B., Murray G.L. Leptospiral outer membrane protein LipL41 is not essential for acute leptospirosis, but requires a small chaperone, Lep, for stable expression. *Infect. Immun.* 2013; 81(8):2768–76. DOI: 10.1128/IAI.00531-13.
12. Donnenberg M.S., Kaper J.B. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect. Immun.* 1991; 59:4310–17. PMID: 1937792. PMCID: PMC259042
13. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97(12):6640–5. DOI: 10.1073/pnas.120163297.
14. Barnes M.G., Weiss A.A. BrkA protein of *Bordetella pertussis* inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition. *Infect. Immun.* 2001; 69(5):3067–72. DOI: 10.1128/IAI.69.5.3067-3072.2001.
15. Prodromou C., Roe S.M., O'Brien R., Ladbury J.E., Piper P.W., Pearl L.H. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 Molecular chaperone. *Cell.* 1997; 90(1):65–75. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80314-1.
16. Pearl L.H., Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.* 2006; 75:271–94. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142738.
17. Hecker M., Schumann W., Völker U. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 1996; 19(3):417–28. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1996.396932.x.
18. Anisimov A.P., Dentovskaya S.V., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Shaikhutdinova R.Z., Balakhonov S.V., Lindner B., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Holst O., Pier G.B., Knirel Y.A. Intraspecific and temperature-dependent variations in susceptibility of *Yersinia pestis* to the bactericidal action of serum and to polymyxin B. *Infect. Immun.* 2005; 73(11):7324–31. DOI: 10.1128/IAI.73.11.7324-7331.2005.
19. Bardwell J.C., Craig E.A. Ancient heat shock gene is dispensable. *J. Bacteriol.* 1988; 170(7):2977–83. DOI: 10.1128/jb.170.7.2977-2983.1988.
20. Schulz A., Schwab S., Homuth G., Versteeg S., Schumann W. The *htpG* gene of *Bacillus subtilis* belongs to class III heat shock genes and is under negative control. *J. Bacteriol.* 1997; 179(10):3103–9 DOI: 10.1128/jb.179.10.3103-3109.1997.
21. Thomas J.G., Baneyx F. Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG *in vivo*. *J. Bacteriol.* 1998; 180(19):5165–72. DOI: 10.1128/JB.180.19.5165-5172.1998.
22. Winston J.L., Toth S.I., Roe B.A., Dyer D.W. Cloning and characterization of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* gene encoding a heat-shock protein 90 homologue. *Gene.* 1996; 179(2):199–204. DOI: 10.1016/S0378-1119(96)00317-4.
23. Fang F., Barnum S.R. The heat shock gene, *htpG*, and thermotolerance in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Curr. Microbiol.* 2003; 47:341–6. DOI: 10.1007/s00284-002-4015-z.
24. Hossain M.M., Nakamoto H. Role for the cyanobacterial HtpG in protection from oxidative stress. *Curr. Microbiol.* 2003; 46:70–6. DOI: 10.1007/s00284-002-3831-5.

Authors:

Krasil'nikova E.A., Shaikhutdinova R.Z., Svetoch T.E., Platonov M.E., Kombarova T.I., Ivanov S.A., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org.

Об авторах:

Красильникова Е.А., Шайхутдинова Р.З., Светоч Т.Э., Платонов М.Е., Комбарова Т.И., Иванов С.А., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболensk. E-mail: info@obolensk.org.