

ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

Rezumat al Tezei de doctorat:

CHAPERONI MOLECULARI ÎN INFECȚII
BACTERIENE LA OVINE

Conducător științific

Dr. ELENA GANEA

Doctorand

LUMINIȚA MONICA VANGHELE

București

2015

CUPRINS

CUPRINS.....	1
1. INTRODUCERE.....	9
2. CONSIDERAȚII TEORETICE.....	12
2.1. Chaperoni moleculari la bacterii.....	12
2.1.1. Sisteme chaperonale majore la bacterii.....	15
2.1.1.1. „Trigger factor” (TF).....	16
2.1.1.2. Sistemul chaperonal DnaK.....	17
2.1.1.2.1. Proteinele substrat ale sistemului DnaK și recunoașterea acestora.....	19
2.1.1.2.2. DnaJ.....	20
2.1.1.2.3. GrpE.....	21
2.1.1.2.4. Ciclul funcțional al sistemului chaperonal DnaK (Hsp 70).....	21
2.1.1.2.5. Rolul <i>in vivo</i> al proteinelor DnaK, DnaJ și GrpE.....	22
2.1.1.3. Sistemul chaperonal GroE (GroEL/GroES).....	25
2.1.1.3.1. Mecanismul de funcționare al sistemului chaperonal GroE.....	26
2.1.1.3.2. Rolul proteinelor GroE (GroEL și GroES) <i>in vivo</i> în condiții normale de creștere și condiții de stres.....	28
2.1.1.3.3. Proteinele substrat ale complexului GroE și recunoașterea acestora.....	29
2.1.1.3.4. Funcții adiționale ale complexului GroE.....	31
2.1.1.3.5. Omologi ai chaperonului molecular GroEL.....	33
2.1.1.4. Alți chaperoni moleculari și rolul acestora în celulă.....	34
2.1.1.5. Rețeaua sistemelor chaperonale din celulă.....	38
2.1.2. Reglarea exprimării genelor chaperonilor moleculari bacterieni în răspunsul la stres.....	39

2.1.2.1. Proteinele nepliate reprezintă un semnal important pentru creșterea exprimării chaperonilor în citoplasmă consecutiv șocului termic.....	40
2.1.2.2. Factorul sigma-32 al ARN polimerazei reglează șocul termic la <i>E. coli</i>	40
2.1.2.3. Stabilitatea factorului σ^{32} la <i>E. coli</i> este afectată de prezența proteinelor nepliate, prin intermediul sistemului chaperonal DnaK.....	40
2.1.2.4. Nivelul factorului σ^{32} este reglat la nivelul translației ARNm de către temperatură.....	41
2.1.2.5. Reglarea răspunsului la șocul termic prin mecanisme bazate pe represor.....	42
2.1.2.6. Activitatea represorului HrcA este controlată de către sistemul chaperonal GroE.....	42
2.2. Infecția bacteriană și răspunsul la stres.....	43
2.2.1. Strategii de supraviețuire a bacteriilor patogene în condiții de stres <i>in vitro</i>	43
2.2.2. Sinteza chaperonilor moleculari ca răspuns la diferite condiții de stres care reproduc mediul intracelular.....	45
2.2.3. Sinteza chaperonilor moleculari ca răspuns la stresul indus de diferite substanțe antimicrobiene și dezinfectante.....	47
2.2.4. Rolul chaperonilor moleculari bacterieni în procesul infecțios.....	48
2.2.4.1. Infecția bacteriană reglează sinteza proteinelor de stres la bacterii și gazdă.....	49
2.2.4.2. Chaperonii moleculari bacterieni – factori de virulență.....	50
2.2.4.3. Funcțiile unor chaperoni moleculari bacterieni specifici în virulență.....	51
2.2.4.4. Chaperonii moleculari bacterieni – ținte ale substanțelor antibacteriene.....	54
2.2.4.5. Chaperonii moleculari bacterieni – antigene imunodominante.....	55
2.2.5. Bacterii patogene intracelulare și strategii de supraviețuire în macrofage.....	55

2.2.6. Identificarea chaperonilor moleculari induși în bacteriile patogene intracelulare în cursul infecției macrofagelor.....	61
2.3. Principalele bacterii implicate în patologia ovinelor.....	62
2.3.1. <i>Brucella ovis</i>	62
2.3.2. <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Abortusovis (<i>Salmonella</i> Abortusovis).....	65
2.3.3. <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	67
3. MATERIALE ȘI METODE.....	70
3.1. Materiale.....	70
3.1.1. Echipamente de laborator.....	70
3.1.2. Software.....	70
3.1.3. Reactivi chimici.....	70
3.1.4. Materiale bacteriologie.....	71
3.1.4.1. Tulpini bacteriene.....	71
3.1.4.2. Medii de cultură.....	72
3.1.4.3. Antibiotice.....	72
3.1.4.4. Teste biochimice.....	72
3.1.5. Materiale pentru metode biochimice.....	73
3.1.5.1. Proteine și materiale.....	73
3.1.5.2. Soluții și tamponi.....	73
3.1.5.3. Kit-uri pentru proteine.....	74
3.1.6. Materiale pentru culturi celulare.....	74
3.1.6.1. Linie celulară și anticorpi.....	74
3.1.6.2. Medii pentru culturi celulare.....	74
3.1.6.3. Soluții și reactivi pentru culturi celulare.....	74
3.1.7. Materiale biologie moleculară.....	74
3.1.7.1. Kit-uri extracție acizi nucleici.....	74
3.1.7.2. Enzime și reactivi PCR și RT-PCR.....	75
3.1.7.3. Primeri și sonde moleculare.....	75

3.1.7.4. Soluții și tamponare.....	77
3.2. Metode.....	78
3.2.1. Metode bacteriologice.....	78
3.2.1.1. Identificarea fenotipică a tulpinilor bacteriene.....	78
3.2.1.2. Determinarea concentrației minime inhibitorii (MIC).....	79
3.2.1.3. Cultivarea tulpinilor bacteriene în diferite condiții de stres <i>in vitro</i>	79
3.2.1.3.1. Cultivarea <i>Brucella ovis</i> în diferite condiții de stres (șoc termic, stres acid și stres oxidativ).....	79
3.2.1.3.2. Cultivarea <i>Salmonella enterica</i> subspecia <i>enterica</i> serovarianta Abortusovis în diferite condiții de stres (șoc termic, stres acid, stres oxidativ, antibiotice).....	80
3.2.1.3.3. Cultivarea <i>Campylobacter fetus</i> subspecia <i>fetus</i> în diferite condiții de stres (șoc termic, stres acid, stres oxidativ).....	80
3.2.1.4. Cultivarea <i>Brucella ovis</i> pe diferite medii de cultură.....	81
3.2.1.5. Teste de adaptare.....	81
3.2.1.6. Determinarea viabilității celulare (testul de supraviețuire) în diferite condiții de stres.....	83
3.2.2. Metode biochimice.....	84
3.2.2.1. Extracția proteinelor totale și determinarea concentrației proteice.....	84
3.2.2.2. SDS-PAGE.....	84
3.2.2.3. Analiza Western blot (imunoblot).....	85
3.2.2.4. Denaturarea și renaturarea proteinelor în prezența și absența chaperonilor moleculari.....	85
3.2.2.4.1. Denaturarea termică și renaturarea catalazei (CAT).....	85
3.2.2.4.2. Denaturarea termică și renaturarea malatdehidrogenazei (MDH).....	86
3.2.2.5. Determinarea activității enzimatiche.....	87

3.2.2.5.1. Descompunerea peroxidului de hidrogen catalizată de catalază.....	87
3.2.2.5.2. Conversia oxaloacetatului la malat catalizată de malat dehidrogenază.....	88
3.2.3. Metode culturi celulare.....	88
3.2.3.1. Obținerea culturii celulare și a pasajelor.....	88
3.2.3.2. Infecția macrofagelor murine.....	89
3.2.4. Metode de biologie moleculară.....	89
3.2.4.1. Extracția ARN total și reverstranscripția (RT).....	89
3.2.4.2. Extracția ADN bacterian.....	90
3.2.4.3. Utilizarea controalelor pentru metodele PCR, RT-PCR semicantitativ și real time RT-PCR cantitativ.....	90
3.2.4.4. Construirea primerilor și sondelor specifice genelor <i>dnaK</i> , <i>groEL</i> și 16S ARNr.....	91
3.2.4.5. Normalizarea probelor de ADNc prin RT-PCR semicantitativ.....	91
3.2.4.6. Metode PCR de identificare a tulpinilor bacteriene.....	91
3.2.4.7. PCR semicantitativ.....	93
3.2.4.8. Real time PCR cantitativ.....	94
3.2.4.9. Analiza statistică.....	95
 4. REZULTATE.....	 96
 4.1. Caracterizarea tulpinilor bacteriene.....	 96
4.1.1. Identificarea tulpinilor bacteriene prin metode bacteriologice clasice.....	96
4.1.2. Identificarea tulpinilor bacteriene prin utilizarea unor elemente genetice specifice.....	100
 4.2. Identificarea și caracterizarea chaperonilor moleculari majori induși în <i>Brucella</i> <i>ovis</i> în condiții de stres.....	 103
4.2.1. Influența condițiilor de stres <i>in vitro</i> (șoc termic, stres oxidativ, pH acid) asupra exprimării chaperonilor moleculari DnaK și GroEL la nivel	

translațional.....	105
4.2.2. Expimarea constitutivă a DnaK și GroEL nu asigură supraviețuirea <i>B. ovis</i> la temperaturi ridicate.....	106
4.2.3. Nivelul de inducție al chaperonilor moleculari DnaK și GroEL este proporțional cu viabilitatea <i>B. ovis</i> în condiții de pH acid.....	107
4.2.4. Sensibilitatea și toleranța adaptativă la pH acid (ATR) la <i>B. ovis</i>	109
4.2.5. Rezistența <i>B. ovis</i> la stresul oxidativ nu se corelează cu exprimarea redusă a chaperonilor moleculari DnaK și GroEL.....	112
4.2.6. Supraviețuirea <i>B. ovis</i> la stresul oxidativ extern presupune un răspuns adaptativ al bacteriei.....	113
4.2.7. Efectul chaperonilor moleculari majori DnaK și GroEL asupra recuperării activității enzimice a malat dehidrogenazei (MDH) denaturate termic la <i>Brucella ovis</i>	115
4.2.8. Nivelul relativ de transcripție al <i>dnaK</i> și <i>groEL</i> se corelează cu nivelul translațional al DnaK și GroEL în diferite condiții de stres <i>in vitro</i> la <i>B. ovis</i>	118
4.2.9. Compoziția mediului de cultură influențează nivelul de exprimare al chaperonilor moleculari DnaK și GroEL, atât la nivel translațional, cât și la nivel transcripțional.....	120
4.2.10. Chaperonii moleculari bacterieni DnaK și GroEL sunt induși în cursul infecției macrofagelor murine J774A.1 cu <i>B. ovis</i>	124
4.2.11. Concluzii.....	125
4.3. Identificarea și caracterizarea chaperonilor moleculară majori induși în <i>Salmonella Abortusovis</i> în condiții de stres.....	127
4.3.1. Nivelul translațional al chaperonilor moleculari DnaK și GroEL este influențat de diferite condiții de stres (șoc termic, pH acid, stres oxidativ și prezența diferitelor antibiotice).....	128
4.3.2. Inducția DnaK și GroEL se corelează cu supraviețuirea <i>S. Abortusovis</i> la temperaturi ridicate și în condiții oxidative.....	134
4.3.3. Adaptarea <i>S. Abortusovis</i> la H ₂ O ₂ induce rezistența la temperaturi ridicate și la condiții oxidative extreme.....	135
4.3.4. Nivelul de inducție al chaperonilor moleculari DnaK și GroEL este	

proporțional cu viabilitatea <i>S. Abortusovis</i> în condiții de pH acid.....	137
4.3.5. Adaptarea <i>S. Abortusovis</i> expusă la pH acid induce toleranța adaptativă la pH acid (ATR) și termotoleranță.....	140
4.3.6. Expunerea la temperaturi moderate induce termotoleranță și crește rezistența <i>S. Abortusovis</i> la condiții acide severe și la antibiotice.....	143
4.3.7. Efectul chaperonilor moleculari majori DnaK și GroEL asupra recuperării activității enzimatică a catalazei (CAT) și malat dehidrogenazei (MDH) denaturate termic la <i>S. Abortusovis</i>	146
4.3.8. Nivelul chaperonilor moleculari DnaK și GroEL în diferite condiții de stres depinde de transcripție.....	153
4.3.9. Concluzii.....	155
4.4. Identificarea și caracterizarea chaperonilor moleculari Dank și GroEL induși în <i>Campylobacter fetus</i> subspecia <i>fetus</i> în condiții de stres.....	157
4.4.1. Viabilitatea celulelor bacteriene după expunerea <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> la șoc termic se corelează cu nivelul translational al chaperonului molecular GroEL.....	158
4.4.2. Exprimarea chaperonilor moleculari majori DnaK și GroEL la nivel translational nu reflectă gradul de rezistență al bacteriei <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> în condiții de stres oxidativ și acid.....	162
4.4.3. Efectul chaperonului molecular major GroEL asupra recuperării activității enzimatică a catalazei (CAT) denaturate termic la <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	164
4.4.4. Inducția genei <i>groEL</i> în condiții de șoc termic determină creșterea nivelului transcripțional al GroEL.....	165
4.4.5. Concluzii.....	167
5. DISCUȚII.....	168
6. CONCLUZII GENERALE.....	179
Mulțumiri.....	181

7. BIBLIOGRAFIE.....182

LUCRĂRI PUBLICATE.....219

ABREVIERI.....221

INTRODUCERE

Numeroase cercetări au ca obiect de studiu proteinele de șoc termic, proteine foarte importante și universal răspândite în lumea vie, incluzând chaperonii moleculari, proteazele ATP-dependente și catalizatorii procesului de pliere, asamblare și reparare a proteinelor în condiții normale și condiții de stres. Având în vedere importanța vitală a chaperonilor moleculari în diferite procese biologice, ca sisteme de control al calității proteinelor, mecanismele de reglare ale răspunsului la stres reprezintă obiecte de studiu de mare interes.

Studiul bacteriilor reprezintă cea mai mare contribuție la cercetarea chaperonilor moleculari, în special *Escherichia coli*, deși au fost studiate și alte bacterii care au oferit modele mult mai generale decât *E. coli* (de ex. *Bacillus subtilis*, *S. Typhimurium*). Aceste studii au oferit informații prețioase despre structura și funcțiile chaperonilor moleculari, dar și despre mecanismele de reglare și de supraviețuire a bacteriilor în condiții de stres. Deși s-au realizat multe studii privind biologia chaperonilor moleculari bacterieni, aprofundarea înțelegerii rolului acestora continuă și în prezent, în contextul disponibilității unui mare număr de secvențe genomice bacteriene și, de asemenea, a multitudinii de tehnici genetice și de biologie moleculară.

La bacterii, chaperonii moleculari majori, DnaK (70 kDa) și GroEL (60 kDa) definesc răspunsul la stres, alături de alte proteine de șoc termic, acesta fiind un mecanism adaptativ care protejează polipeptidele bacteriene, prevenind agregarea sau plierea eronată într-un mediu nefavorabil. În acest context, infecția bacteriană reprezintă un factor de stres atât pentru bacteriile patogene, cât și pentru gazdă, care reglează sinteza proteinelor de stres în organismul infectat, dar presupune și o suplimentare a producției chaperonilor moleculari bacterieni în vederea supraviețuirii procesului infecțios.

În lucrarea de față s-a realizat studierea comparativă a exprimării la nivel transcriptional și translațional a chaperonilor moleculari majori DnaK și GroEL la principalele bacterii implicate în patologia ovinelor (*B. ovis*, *S. Abortusovis* și *C. fetus* subsp. *fetus*), în diferite condiții de stres care reproduc mediul lor natural și în condiții normale de creștere.

Principalele aspecte urmărite în această lucrare au fost:

- 1) evaluarea implicării chaperonilor moleculari în adaptarea bacteriilor patogene studiate la condițiile de stres care definesc procesul infecțios, ceea ce poate contribui la înțelegerea mecanismelor complexe ale patogenității acestora;
- 2) aprofundarea înțelegerii mecanismelor de control ale răspunsului la stres, definit de chaperonii moleculari DnaK și GroEL și a relației dintre răspunsul la stres și supraviețuirea bacteriilor patogene studiate, atât în mediul extern, cât și în organismul infectat;
- 3) investigarea asocierii chaperonilor moleculari majori DnaK și GroEL cu rezistența la antibiotice;
- 4) evaluării posibilității de dezvoltare a metodologiei de diagnostic a brucelozelor, prin elaborarea unei metode noi, bazate pe cuantificarea exprimării genelor care codifică chaperonii moleculari majori DnaK și GroEL.

Implicarea chaperonilor moleculari în supraviețuirea bacteriilor patogene aparținând speciilor din genul *Brucella*, *Campylobacter* și *Salmonella* cu importanță în patologia umană a fost studiată anterior (Hendrick și Hartl, 1993; Lin și Ficht, 1995a; Köhler și colab., 1996; Rafie-Kolpin și colab., 1996; Teixeira-Gomes și colab., 2000; Köhler și colab., 2002a, Morgan și colab., 1986, Klancnik și colab., 2006), însă, până în prezent, nu s-au realizat studii similare la speciile de interes veterinar non-zoonotice sau considerate condiționat-patogene pentru om, deși infecțiile produse de aceste bacterii pot reprezenta importante probleme economice în multe țări.

Brucella ovis, *Salmonella Abortusovis* și *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* sunt bacterii patogene care afectează aparatul reproducător al ovinelor și prezintă restricție sau specificitate de gazdă, ceea ce presupune o serie de mecanisme de patogenitate adaptative specializate pentru supraviețuirea și diseminarea bacteriilor în condițiile ostile din organismul gazdei. În acest context, rezultatele obținute în această lucrare, privind implicarea chaperonilor moleculari în adaptarea bacteriilor patogene studiate la condițiile de stres care definesc procesul infecțios, contribuie la înțelegerea mecanismelor complexe ale patogenității acestora, a relației dintre răspunsul la stres și supraviețuirea bacteriilor patogene studiate, atât în mediul extern, cât și în organismul infectat. Demonstrarea asocierii chaperonilor moleculari majori DnaK și GroEL cu rezistența la antibiotice la *S. Abortusovis* reprezintă unul din aspectele originale ale acestei lucrări.

Până în prezent, cuantificarea la nivel transcripțional a exprimării chaperonilor moleculari la bacterii patogene a fost mai puțin studiată, astfel încât demonstrarea

dependenței sintezei DnaK și GroEL de etapa de transcripție aduce o contribuție importantă la cunoașterea și utilizarea tehnicii real time RT-PCR cantitativ, atât în studierea comparativă a exprimării diferitelor proteine de șoc termic la bacterii, cât și în diagnosticul unor infecții bacteriene.

Obiectivele acestei lucrări au fost abordate și realizate într-o manieră originală și complexă, prin utilizarea unor metode specifice de bacteriologie, biochimie, biologie celulară și moleculară, pentru studierea comparativă a sintezei chaperonilor moleculari DnaK și GroEL și a transcripției genelor care codifică aceste proteine la cele trei bacterii patogene studiate, atât în condiții normale, cât și în condiții de stres.

CONSIDERAȚII TEORETICE

Chaperoni moleculari la bacterii

Chaperonii moleculari sunt proteine de șoc termic universal răspândite în lumea vie, cu o importanță vitală în diferite procese biologice, ca sisteme de control al calității proteinelor, astfel încât mecanismele de reglare ale răspunsului la stres reprezintă obiecte de studiu interesante pentru foarte mulți cercetători. În condiții normale, chaperonii moleculari sunt prezenți în concentrații scăzute în celule, dar, în condiții de stres, aceștia se acumulează la nivele foarte ridicate (Hendrix, 1979; Kohler și colab., 2002a), permițând celulelor să supraviețuiască.

La *E. coli* au fost identificate patru sisteme chaperonale majore și anume: (a) „Trigger factor” (TF); (b) sistemul Hsp70 (DnaK/DnaJ/GrpE); (c) sistemul Hsp60 (GroEL/GroES); (d) ATP-azele Clp (ClpA/ClpB/ClpX/ClpY).

Sistemul chaperonal DnaK

Sistemul chaperonal major din citoplasma *E. coli* capabil să asiste plierea lanțurilor polipeptidice aflate într-o conformație extinsă este sistemul Hsp70 (Hesterkamp și Bukau, 1998). Acest sistem este reprezentat de către complexul DnaK/DnaJ/GrpE.

Chaperonul molecular DnaK are rol în asistarea plierii proteinelor, alături de alți chaperoni moleculari, dar și ca mecanism de reparare a proteinelor denaturate în condiții de stres. Chaperonii DnaK îndeplinesc două roluri importante în celulele supuse stresului în care proteinele se depliază și anume: limitarea extinderii agregării proteinelor și reactivarea proteinelor devenite inactivate prin expunerea la temperaturi ridicate odată cu revenirea lor la condiții normale (alături de alt chaperon, ClpB).

Sistemul chaperonal GroE (GroEL/GroES)

Sistemul chaperonal GroE (GroEL/GroES), singurul sistem chaperonal din citoplasma *E. coli* esențial pentru viabilitate în toate condițiile de creștere (Fayet și colab., 1989; Horwich și colab., 1993), asigură plierea unui lanț polipeptidic aflat într-o conformație compactă pentru a ajunge la starea lui nativă. Comparativ cu supraviețuirea mutanților DnaK, deleția GroEL este letală la orice temperatură (Fayet și colab., 1989). La *E. coli*, proteinele GroE sunt esențiale pentru creșterea atât în condiții normale, cât și în condiții de stres, rolul acestora fiind legat de abilitatea de a ajuta proteinele să se plieze corect. Pe lângă interacțiunile posttranslationale cu GroEL care au loc în condiții normale, polipeptidele reacționează, de asemenea, cu GroEL în condiții de stres termic sau chimic. În

aceste condiții, proteinele native sunt supuse depliei și agregatele proteice intermediare rezultate se pot atașa de GroEL și pot, în cele din urmă, când se revine la condiții normale, să fie repliate la forma nativă sau eliberate altor chaperoni sau mecanismelor proteolitice (Fenton și Horwich, 1997).

La bacterii, exprimarea genelor de șoc termic este controlată la nivel transcripțional prin mecanisme complexe pozitive și negative. În general, reglarea genelor de șoc termic la bacterii este complexă, presupunând o combinație a acestor mecanisme (Narberhaus, 1999). Un semnal major al suprareglării exprimării unor chaperoni moleculari este șocul termic. Există și câteva cazuri unde chaperonii moleculari nu sunt induși de șocul termic, dar răspund la alți factori de stres din mediul extern. Un alt semnal, indirect, care ar face celula capabilă să răspundă la stresul non-termic ce determină deplierea proteinelor, ar fi însăși prezența proteinelor depliate, un semnal potențial pentru inducția proteinelor de șoc termic.

Studierea chaperonilor moleculari majori, DnaK (70 kDa) și GroEL (60 kDa), a demonstrat inducția lor în diferite condiții de stres *in vitro* (șoc termic, pH acid, stres oxidativ, osmotic, salin, radiații UV, etanol, antibiotice, metale grele și compuși aromatici) la o serie de bacterii, de exemplu *E. coli*, *Lactobacillus rhamnosus*, *A. calcoaceticus* (Bianchi și Baneyx, 1999; Benndorf și colab., 2001; Prasad și colab., 2003). Aceste studii au oferit informații prețioase despre structura și funcțiile chaperonilor moleculari, dar și despre mecanismele de reglare și de supraviețuire a bacteriilor patogene în diferite condiții de stres, inclusiv procesul infecțios.

Infecția bacteriană reglează sinteza proteinelor de stres la bacterii și gazdă

Infecția bacteriană este un proces foarte complex, care presupune existența unui cumul de factori de stres, atât pentru bacteria patogenă, cât și pentru gazdă. Ca răspuns al bacteriei la această mare varietate de factori de stres implicați în procesul infecțios, sunt activate mecanisme de patogenitate, specifice și nespecifice, inclusiv producerea de chaperoni moleculari, cu dublu scop, pe de o parte, de apărare împotriva gazdei, și, pe de altă parte, cu scopul de a controla infecția.

Chaperonii moleculari bacterieni au fost studiați și în condiții de stres *in vivo*, în cursul infecției macrofagelor sau a celulelor epiteliale, în cazul unor bacterii patogene facultativ intracelulare (Abshire și Neidhardt, 1993; Lin și Ficht, 1995; Takaya și colab., 2004). Infecția bacteriană reglează sinteza proteinelor de stres în organismul infectat, dar

presupune și o suplimentare a producției chaperonilor moleculari bacterieni în vederea supraviețuirii procesului infecțios.

Chaperonii moleculari la bacteriile patogene aparținând speciilor genului *Brucella*, *Campylobacter* și *Salmonella* cu importanță în patologia umană, au fost studiați de o serie de autori (Foster, 1991; Lin și Ficht, 1995a; Teixeira-Gomes și colab., 2000; Kohler și colab., 2002; Takaya și colab., 2004; Klancnik și colab., 2006). Cu toate acestea până în prezent nu s-au realizat studii similare la *B. ovis*, *S. Abortusovis* și *C. fetus* subsp. *fetus*, deși infecțiile produse de aceste bacterii pot reprezenta importante probleme economice în multe țări (Jack, 1968; Pardon și colab., 1988; Blasco, 1990; Uzzau și colab., 2000).

B. ovis, *S. Abortusovis* și *C. fetus* subsp. *fetus* sunt bacterii patogene pentru ovine, care afectează tractusul reproducător al acestora, alături de alte bacterii, de exemplu *Chlamydia*, *Coxiella*, *Listeria*, *Toxoplasma* și *Yersinia* (Beuzón și colab., 1997). Pe de altă parte, *B. ovis*, *S. Abortusovis* și *C. fetus* subsp. *fetus* sunt bacterii patogene cu restricție sau specificitate de gazdă, ceea ce presupune existența unor mecanisme de patogenitate adaptative sau defensive (Kim și colab., 2000), comune sau specifice, în funcție de relația patogen-gazdă, de localizarea sau tropismul tisular al acestor bacterii patogene, de condițiile de stres din mediul intracelular.

Răspunsul la stresul reprezentat de infecția bacteriană este un mecanism adaptativ care protejează polipeptidele bacteriene, prevenind agregarea sau plierea eronată a acestora într-un mediu celular ostil (Gomes și Simão, 2009), amplificând astfel șansele bacteriilor patogene de a supraviețui și de a disemina în organismul gazdei.

REZULTATE

Identificarea și caracterizarea chaperonilor moleculară majori induși în

***B. ovis* în condiții de stres**

Pentru înțelegerea contribuției chaperonilor moleculari majori DnaK și GroEL la supraviețuirea și persistența intracelulară a acestei bacterii facultativ intracelulare, în prezenta lucrare am analizat exprimarea la nivel transcriptional și translațional a chaperonilor menționați, în diferite condiții de stres *in vitro* (șoc termic, stres oxidativ și pH acid) care reproduc mediul intracelular, comparativ cu exprimarea acestor proteine în cursul infecției macrofagelor murine J774A.1 cu *B. ovis*.

Chaperonii moleculari DnaK și GroEL se exprimă, în condiții de stres termic și acid, la un nivel superior exprimării constitutive a acestora. În condiții oxidative, nivelul de sinteză al DnaK rămâne constant, în timp ce proteina GroEL înregistrează o ușoară reducere a exprimării la nivel translațional (Figura 1).

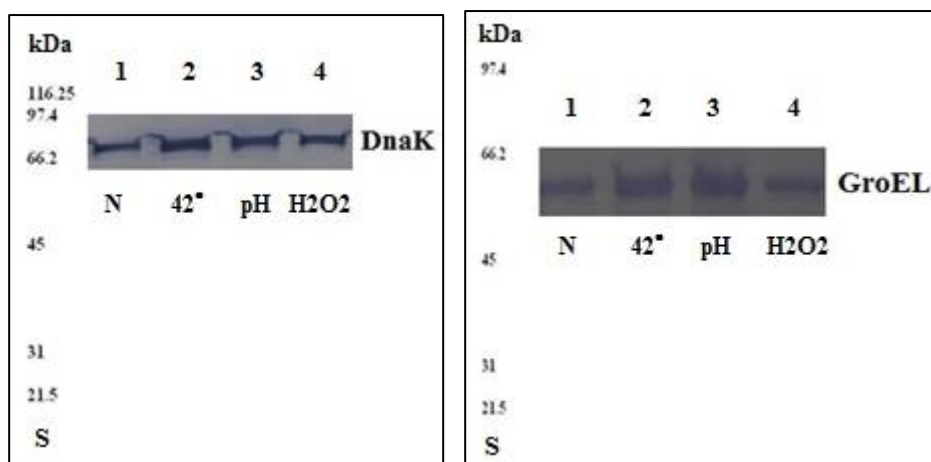


Figura 1: Analiza Western blot a exprimării chaperonilor moleculari DnaK (A) și GroEL (B) după expunerea culturii de *B. ovis* în TSB la diferite condiții de stres. S: Standard de masă moleculară SDS-PAGE (kDa); linia 1: condiții normale (N); linia 2: șoc termic (42°C); linia 3: pH 5,5 (pH); linia 4: 5 mM H₂O₂ (H₂O₂).

Nivelul relativ de transcripție al genelor *dnaK* și *groEL* se corelează cu nivelul translațional al DnaK și GroEL în diferite condiții de stres *in vitro* la *B. ovis*. În urma rezultatele obținute în cursul infecției macrofagelor murine, s-a evidențiat supraexprimarea chaperonilor moleculari DnaK și GroEL la nivel transcriptional.

Pre-expunerea la o concentrație subletală de peroxid de hidrogen permite celulelor bacteriene să se adapteze, astfel încât să poată supraviețui ulterior expunerii la concentrații mari de peroxid de hidrogen, dar rezistența relativ ridicată a *B. ovis* la stresul oxidativ nu s-a corelat cu nivelul de exprimare al chaperonilor moleculari GroEL și DnaK (Figura 2).

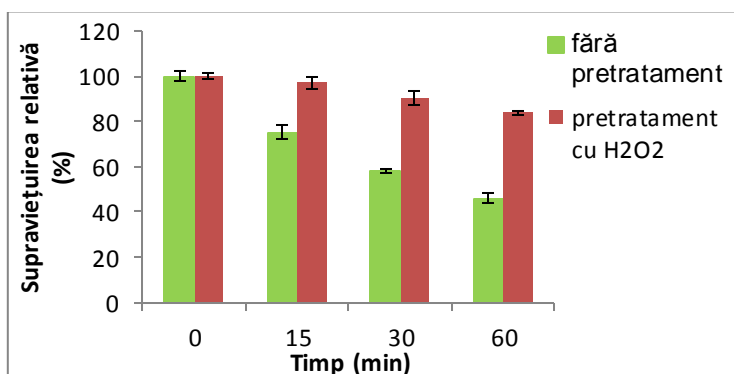


Figura 2. Efectul adaptării la peroxid de hidrogen asupra supraviețuirii *B. ovis*. Bacteriile au fost crescute într-o atmosferă ce conține 5% CO₂ pentru 48 h la 37°C în mediul BHI (pH 7,2). Pentru testarea răspunsului de toleranță adaptativă, culturile de *B. ovis* au fost împărțite în două grupe, grupul de control (fără pretratament cu H₂O₂) și grupul expus pretratamentului cu 1 mM H₂O₂ pentru 1 h. Ulterior, culturile au fost incubate cu 5 mM peroxid de hidrogen (concentrație finală), pentru 60 minute.

Nivelurile de exprimare a chaperonilor moleculari majori DnaK și GroEL la *B. ovis* în condiții de pH redus și șoc termic au fost mai mari într-un mediu complex (BHI cu 5% glucoză) decât în mediul minimal TSB (Figura 3).

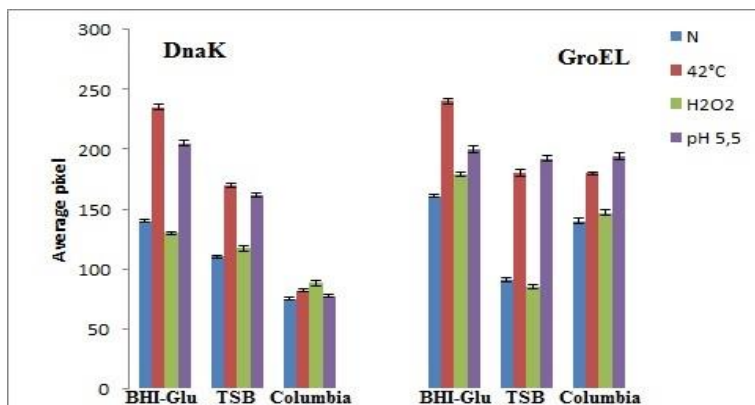


Figura 3. Cuantificarea proteinelor DnaK și GroEL la *B. ovis* prin scanarea densitometrică a benzilor obținute prin Western blot (average pixel): TSB; BHI cu 5% glucoză; agar Columbia. (N) condiții normale, (42°C) șoc termic, (H2O2) 50 mM H₂O₂ și (pH 5,5) pH acid.

Prezența în amestecul de denaturarea a chaperonilor moleculari a avut un efect protector specific asupra enzimei MDH, permițând renaturarea acesteia. Cea mai mare rată de renaturare a MDH (83%), de aproximativ 4 ori mai mare, s-a înregistrat în prezența ambelor sisteme chaperonale

Identificarea și caracterizarea chaperonilor moleculară majori induși în *Salmonella Abortusovis* în condiții de stres

În a doua parte a acestei lucrări s-a studiat exprimarea chaperonilor moleculari DnaK și GroEL la o tulpină multirezistentă de *S. Abortusovis*, după expunerea la o serie de condiții de stres *in vitro* (șoc termic, pH acid, stres oxidativ și prezența antibioticelor), prin analiza Western blot, real time RT-PCR cantitativ și RT-PCR semicantitativ, iar rezultatele au fost comparate cu cele obținute în condiții normale de creștere. Studiul realizat la *S. Abortusovis* a demonstrat influența diferitelor condiții de stres asupra nivelului translațional și transcripțional al chaperonilor moleculari DnaK și GroEL.

Expunerea celulelor de *S. Abortusovis* la temperaturi ridicate, condiții acide și oxidative determină supraexprimarea chaperonilor moleculari DnaK și GroEL (Figura 4), însă implicarea proteinei GroEL în rezistența *S. Abortusovis* la peroxid de hidrogen nu a putut fi demonstrată. Corelația dintre supra-exprimarea chaperonilor moleculari majori și supraviețuirea celulelor de *S. Abortusovis* în condiții de șoc termic, condiții acide și

oxidative sugerează necesitatea unui nivel superior de exprimare al proteinelor DnaK și GroEL comparativ cu nivelul constitutiv.

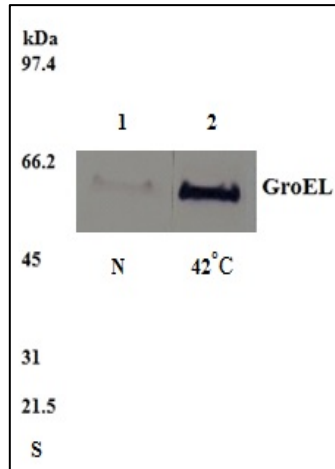
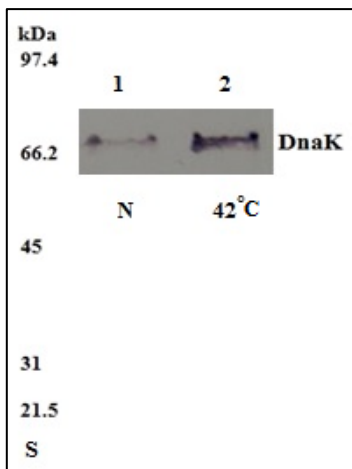


Figura 4: Analiza Western blot a exprimării chaperonilor moleculari DnaK (A) și GroEL (B) în *S. Abortusovis* după expunerea celulelor bacteriene la șocul termic (42°C). S: Standard de masă moleculară SDS-PAGE (kDa) (S); linia 1: condiții normale (N); linia 2: șoc termic (42°C)

Comparativ cu nivelul constitutiv de exprimare al DnaK și GroEL, s-a înregistrat o supraexprimare a acestora ca răspuns al *S. Abortusovis* la expunerea la antibioticele testate (kanamicină, streptomycină, gentamicină, acid nalidixic și tetraciclină), cu excepția streptomicinei, prezența acesteia neinfluențând nivelul translațional al GroEL (Figura 5).

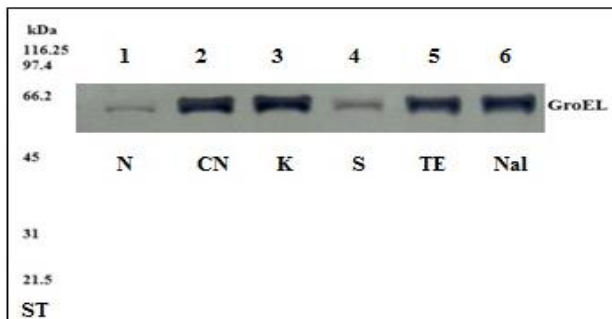
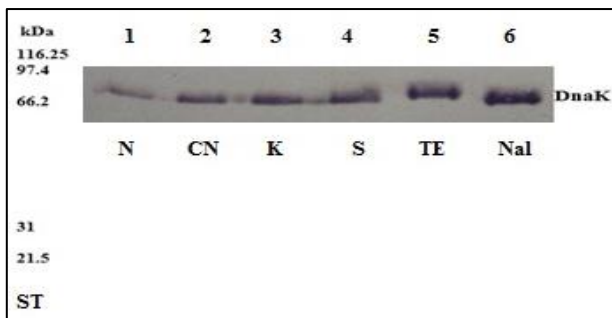


Figura 5: Analiza Western blot a exprimării chaperonilor moleculari DnaK (A) și GroEL (B) în *S. Abortusovis* după expunerea la diferite antibiotice.

ST: Marker de masă moleculară SDS-PAGE (kDa); linia 1: condiții normale (N); linia 2: gentamicină (CN); linia 3: kanamicină (K); linia 4: streptomycină (S); linia 5: tetraciclină (TE); linia 6: acid nalidixic (NA)

Adaptarea *S. Abortusovis* la H₂O₂ induce rezistența la temperaturi ridicate și la condiții oxidative extreme. Adaptarea *S. Abortusovis* la peroxid de hidrogen se corelează cu exprimarea chaperonului molecular DnaK în condiții de stres oxidativ moderat.

Expunerea la o temperatură moderată induce termotoleranță și crește rezistența *S. Abortusovis* la condiții acide severe și la antibiotice. Termotoleranța și toleranța la acid se corelează cu supra-exprimarea chaperonilor moleculari DnaK și GroEL în condiții de șoc termic și pH acid. Adaptarea *S. Abortusovis* expusă la pH acid induce toleranță adaptativă la pH acid (ATR) și termotoleranță (Figura 6).

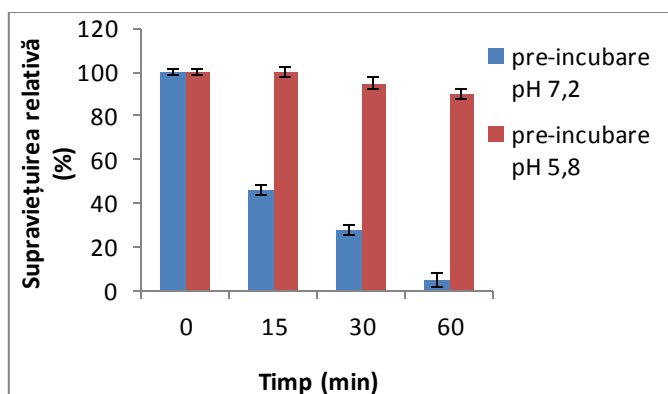


Figura 6: Efectul adaptării la pH 5,8 asupra supraviețuirii *S. Abortusovis* la pH 3,3. Bacteriile au fost crescute în aerobioză pentru 41 h la 37°C în BHI (pH 7,2) și pH a fost modificat la 5,8. După 6 ore, pH-ul mediului a fost modificat la 3,3. Numărul de celule viabile a fost determinat prin realizarea de diluții seriale în PBS, dispersare pe mediu solid MH și incubare la 37°C pentru 48

Datele obținute indică o creștere majoră a nivelului transcripțiilor *dnaK* și *groEL* în toate experimentele realizate *in vitro*, în diferite condiții de stres, inclusiv în prezența antibioticelor (Tabel 1), cu excepția transcripției genei *groEL* în condiții oxidative.

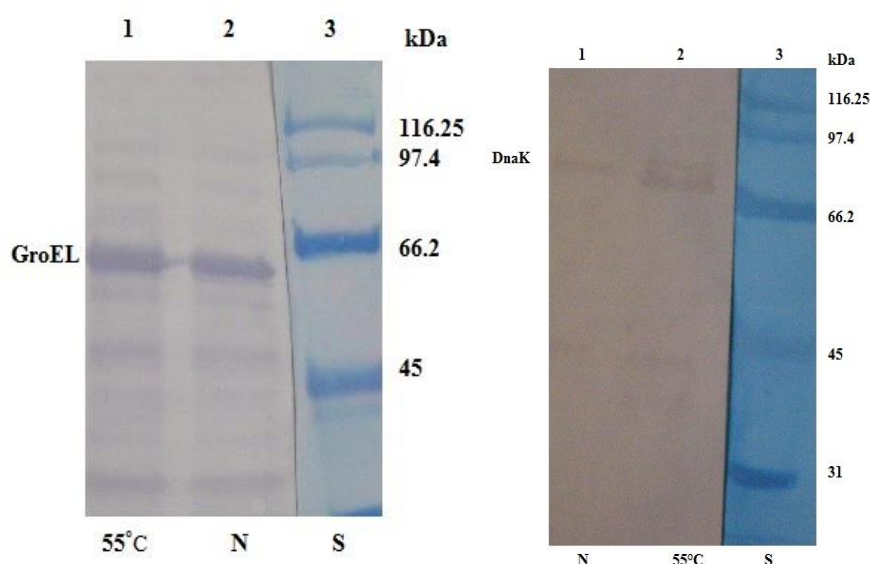
Tabel 1. Transcripția relativă a genelor *dnaK* și *groEL* determinată prin real time RT-PCR cantitativ la *S. Abortusovis* în prezența diferitelor antibiotice: N: condiții normale; CN: gentamicină; K: kanamicină; S: streptomycină; TE: tetraciclină; NA: acid nalidixic; R: transcripția relativă determinată prin metoda $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak și Schmittgen, 2001).

Gena	Nivel de transcripție relativă (R)					
	Condiții normale (N)	Gentamicină (CN)	Kanamicină (K)	Streptomycină (S)	Tetraciclină (TE)	Acid nalidixic (NA)
<i>groEL</i>	1±0,24	6,1±0,33	5,9±0,09	1,6±0,14	4,4±0,16	5,2±0,22
<i>dnaK</i>	1±0,52	1,7±0,04	2,24±0,07	2,6±0,16	4,1±0,62	4,9±0,65

La *S. Abortusovis*, DnaK și GroEL asigură o protecție semnificativă și specifică a CAT, ceea ce sugerează rolul important al acestor chaperoni moleculari în stabilizarea enzimei CAT. În absența chaperonilor moleculari DnaK și GroEL nu s-a observat recuperarea activității enzimice a CAT din lizatele bacteriene la *S. Abortusovis*. Cooperarea celor două sisteme chaperonale DnaK și GroEL în procesul de repliere a enzimei MDH denaturate termic a fost demonstrată și la *S. Abortusovis*.

Identificarea și caracterizarea chaperonilor moleculari DnaK și GroEL induși în *Campylobacter fetus* subspecia *fetus* în condiții de stres

În condiții de șoc termic (55°C), s-a evidențiat supraexprimarea chaperonului molecular GroEL, viabilitatea celulelor bacteriene după expunerea *C. fetus* subsp. *fetus* la șoc termic corelându-se cu nivelul translational al acestui chaperon molecular. Nu s-a putut evidenția o exprimare semnificativă a chaperonului molecular DnaK prin expunerea bacteriei *C. fetus* subsp. *fetus* la șocul termic (55°C), comparativ cu exprimarea acestei proteine în condiții normale de temperatură (37°C) (Figura 7). De asemenea, nu s-a putut evidenția inducția chaperonilor moleculari majori DnaK și GroEL în condiții acide și oxidative, ceea ce nu reflectă gradul de rezistență al bacteriei *C. fetus* subsp. *fetus* în aceste



condiții.

Figura 7: Analiza Western blot a exprimării chaperonilor moleculari GroEL și DnaK în *C. fetus* subsp. *fetus* după expunerea celulelor bacteriene la șocul termic (55°C). N - condiții normale; 55°C - șoc termic; S - Standard de masă moleculară SDS-PAGE (kDa).

Rezultatele obținute în acest studiu prin cuantificarea exprimării genelor *dnaK* și *groEL* prin real time RT-PCR cantitativ la *C. fetus* subsp. *fetus* se corelează cu observațiile care rezultă din studierea exprimării celor doi chaperoni moleculari majori la nivel translational.

GroEL conferă protecție specifică CAT la inactivarea termică (77% la 55°C). Nu s-a observat reactivarea spontană a CAT la *C. fetus* subsp. *fetus*.

CONCLUZII GENERALE

Cercetările realizate în cadrul acestei lucrări s-au concentrat asupra exprimării la nivel transcripțional și translațional al chaperonilor moleculari majori DnaK și GroEL la principalele bacterii implicate în patologia ovinelor (*B. ovis*, *S. Abortusovis* și *C. fetus* subsp. *fetus*), în diferite condiții de stres (șoc termic, stres oxidativ, pH acid, infecția macrofagelor, prezența antibioticelor, a diferitelor componente a mediilor de cultură), comparativ cu exprimarea DnaK și GroEL în condiții normale de creștere. Astfel, s-a urmărit evaluarea implicării chaperonilor moleculari în mecanismele complexe ale patogenității acestor bacterii cu restricție sau specificitate de gazdă, a asocierii lor cu rezistența la antibiotice, precum și înțelegerea mecanismelor de control al răspunsului la stres, definit de acești chaperoni moleculari bacterieni, care pot îmbunătăți rezistența celulelor bacteriene la condițiile din mediul intra- și extracelular, inclusiv la mecanismele bactericide ale macrofagelor.

Rezultatele obținute au condus la următoarele concluzii:

- 1) Importanța chaperonilor moleculari majori DnaK și GroEL pentru supraviețuirea bacteriilor patogene studiate în diferite condiții de stres care definesc procesul infecțios variază, inducția acestora fiind mai puțin relevantă pentru *C. fetus* subsp. *fetus*, o bacterie patogenă rezistentă la fagocitoză. Datele obținute sugerează importanța mediului intramacrofagic ostil în reglarea răspunsului la stres în cazul bacteriilor facultativ intracelulare cu restricție de gazdă (*B. ovis* și *S. Abortusovis*).
- 2) Chaperonii moleculari bacterieni DnaK și GroEL au capacitatea de a conferi protecție specifică împotriva inactivării termice și de a asista replierea, după denaturare, a celor două enzime bacteriene studiate, CAT și MDH, eficiența acestui proces fiind dependentă de complexul proteină substrat-chaperon molecular. Rezultatele obținute confirmă implicarea chaperonilor moleculari DnaK și GroEL în mecanismul de supraviețuire a bacteriilor patogene studiate, prin menținerea conformației native a proteinelor citoplasmice bacteriene.
- 3) Sinteza DnaK și GroEL la bacteriile studiate depinde de transcripție și se corelează cu nivelul translațional al DnaK și GroEL în diferite condiții de stres, reglarea răspunsului la stres, atât la nivel transcripțional, cât și translațional putând

îmbunătăți rezistența celulelor bacteriene la condițiile externe, inclusiv la mecanismele bactericide ale macrofagelor.

- 4) La *B. ovis* și *S. Abortusovis*, corelarea nivelului de sinteza a chaperonilor moleculari DnaK și GroEL cu preadaptarea la diferite condiții de stres, sugerează existența unui mecanism de toleranță adaptativă implicat în reglarea răspunsului la stres, care protejează celulele bacteriene, inclusiv în cursul procesului infecțios.
- 5) La *S. Abortusovis*, prezența antibioticelor determină supraexprimarea chaperonilor moleculari DnaK și GroEL, ca răspuns al bacteriei la aceste condiții de stres, rezultatele obținute sugerând implicarea chaperonilor moleculari în rezistența la antimicrobiene.

Această lucrare de interferență, aflată la granița dintre bacteriologia veterinară, biochimie și biologia moleculară, reprezintă prima analiză a chaperonilor moleculari DnaK și GroEL la *B. ovis*, *S. Abortusovis* și *C. fetus* subsp. *fetus*, informațiile noi aduse de aceasta contribuind la înțelegerea mecanismelor complexe ale patogenității bacteriilor studiate și a mecanismelor de reglare a răspunsului la stresul reprezentat de procesul infecțios.

Creșterea sintezei DnaK și GroEL în prezența antibioticelor la *S. Abortusovis* reprezintă prima raportare a implicării chaperonilor moleculari în rezistența la antimicrobiene a acestei bacterii patogene, cele două proteine putând fi ținte ale unor noi antibiotice.

Rezultatele obținute la *B. ovis* sunt promițătoare pentru dezvoltarea metodologiei de diagnostic a brucelozelor, prin elaborarea unei metode noi, bazate pe cuantificarea exprimării genelor care codifică chaperonii moleculari majori DnaK și GroEL, care, în condiții de cultivare bine definite, ar putea diferenția între specii ale genului *Brucella* implicate în patologia ovinelor.

Mulțumiri

Mulțumesc doamnei Dr. Elena Ganea pentru sprijinul, îndrumarea și ajutorul acordat pe parcursul perioadei de cercetare și elaborare a acestei teze de doctorat, pentru timpul, efortul și încrederea pe care le-a investit pentru finalizarea acestei teze. În toți acești ani, am învățat de la domnia sa ce înseamnă rigurozitatea, tenacitatea și respectul pentru tot ceea ce facem în activitatea noastră.

Mulțumesc tuturor membrilor comisiei de doctorat, domnului academician Prof. Octavian Popescu, doamnei Prof. Dr. Marieta Costache și domnului Conf. Dr. Ștefan Nicolae, pentru răbdarea cu care au analizat această lucrare, precum și pentru sugestiile formulate.

Mulțumesc, de asemenea, doamnei Dr. Handan Coste, șefa Serviciului de Biologie Moleculară și OMG și doamnei Dr. Maria Ionescu, șefa Serviciului de Bacteriologie, precum și tuturor colegilor mei din Institutul de Diagnostic și Sănătate Animală care m-au sprijinit și încurajat pe parcursul acestor ani de cercetări.

Bibliografie selectivă:

1. Abshire KZ and Neidhardt FC (1993) Analysis of proteins synthesized by *Salmonella typhimurium* during growth within a host macrophage. *J Bacteriol.* 175: 3734-3743.
2. Al Dahouk S, Scholz HC, Tomaso H, Bahn P, Göllner C, Karges W, Appel B, Hensel A, Neubauer H, Nöckler K (2010). Differential phenotyping of *Brucella* species using a newly developed semi-automated metabolic system. *BMC Microbiol.* 10: 269.
3. Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciochini AE, Ugalde R, Moreno E, Moriyon I, Gorvel JP (2005) Cyclic beta-1,2-glucan is a brucella virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol.* 6: 618–625.
4. Asai T., Sato C., Masani K., Usui M., Ozawa M., Ogino T., Aoki H., Sawada T., Izumiya H., Watanabe H. (2010). “Epidemiology of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolates from food-producing animals in Japan”, *BioMed Central, Gut Pathogens*, 2(7), 1-5.
5. Asea A, Rehli M, Kibingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, and Calderwood SK (2002) Novel signal transduction pathway utilised by extracellular HSP70. Role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277:15028-15034.
6. Atanassov C, Pezennec L, d'Alayer J, Grollier G, Picard B, and Fauchere J-L (2002) Novel antigens of *Helicobacter pylori* correspond to ulcer-related antibody. *J Clin Microbiol* 40:547-552.

7. Bae Joo-eun (1999) Generation of baculovirus-*Brucella abortus* heat shock protein recombinants; mice immune responses against the recombinants and *B. abortus* superoxide dismutase and L7/L12 recombinant proteins, dissertation for the degree of Doctor of philosophy in Veterinary Medical Science, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University.
8. Bandara AB, Contreras A, Contreras-Rodriguez A, Martins AM, Dobrean V, Poff-Reichow S, Rajasekaran P, Sriranganathan N, Schurig GG, Boyle SM (2007) *Brucella suis* urease encoded by *ure1* but not *ure2* is necessary for intestinal infection of BALB/c mice. *BMC Microbiol.* 7: 1-14.
9. Banerjee S, Hess D, Majumder P, Roy D, and Das S (2004) The interactions of *Allium sativum* leaf agglutinin with a chaperonin group of unique receptor proteins isolated from a bacterial endosymbiont of the mustard aphid. *J Biol Chem.* 279:23782-23789.
10. Barnett ME, Zolkiewska A, and Zolkiewski M (2000) Structure and activity of ClpB from *Escherichia coli*. Role of the amino- and -carboxyl-terminal domains. *J Biol Chem.* 275(48):37565-71.
11. Basak C, Pathak SK, Bhattacharyya A, Pathak S, Basu J, and Kundu M (2005) The secreted peptidyl prolyl cis,trans-isomerase HP0175 of *Helicobacter pylori* induces apoptosis of gastric epithelial cells in a TLR4- and apoptosis signal-regulating kinase 1-dependent manner. *J Immunol.* 174: 5672-5680.
12. Becker J and Craig EA (1994) Heat shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem.* 219: 11-23.
13. Benndorf D., Loffhagen N., and Babel W. (2001). „Protein synthesis patterns in *Acinetobacter calcoaceticus* induced by phenol and catechol show specificities of responses to chemostress“, *FEMS Microbiology Letters*, 200, 247-252.
14. Cash P (2011) Investigating pathogen biology at the level of the proteome. *Proteomics.* 11: 3190-3202., Vol. 41, 753-762, July 1985, Copyright © 1985 by MIT 074./80
15. Calhoun LN, Liyanage R, Lay JO Jr, Kwon Ym (2010) Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis following propionate adaptation. *BMC Microbiol.* 10: 1-11.
16. Butt T., Khan M. Y., Ahmad R. N., Salman M., Afzal R. K. (2006). “Validity of nalidixic acid screening in Fluoroquinolone-resistant typhoid salmonellae”, *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, 16(1), 31-34.
17. Celli J (2006) Surviving inside a macrophage: The many ways of *Brucella*. *Res Microbiol.* 157: 93-98.
18. Ercis S., Erdem B., Hascelik G., Gür D. (2006). “Nalidixic acid resistance in *Salmonella* strains with decreased susceptibility to ciprofloxacin isolated from humans in Turkey”, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 59(2), 117-119.
19. Ganea Elena (2001) Chaperone-like activity of α -crystallin and other small heat shock proteins. *Curr Protein Pept Sc.* 2: 205-225.
20. Gerlach RG and Hensel M (2007) *Salmonella* pathogenicity islands in host specificity, host pathogen-interactions and antibiotics resistance of *Salmonella enterica*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 120: 317-327.
21. Gorvel JP and Moreno E (2002) *Brucella* intracellular life: From invasion to intracellular replication, *Vet Microbiol.* 90: 281-297.

LUCRĂRI PUBLICATE

1. Luminita Monica Vanghele, Maria Ionescu, Handan Coste and Elena Ganea. Association of DnaK and GroEL with Antimicrobial Resistance In Salmonella Abortusovis. International Journal of Veterinary Medicine: Research & Reports. *In press*
2. Luminita Monica Vanghele, Maria Ionescu, Handan Coste and Elena Ganea (2013) Induction of DnaK and GroEL in Brucella Ovis under Various Stress Conditions. International Journal of Veterinary Medicine: Research & Reports. Vol. 2013, Article ID 729541.
3. Monica Vanghele and Elena Ganea, The Role of Bacterial Molecular Chaperone In Pathogen Survival Within the Host (2010) ROM. J. BIOCHEM., 47, 1, 87–100.