

**Proiect Idei 296/2007**  
**Cod proiect 810**

**ROLUL PROTEINELOR SE SOC TERMIC IN PATOGENEZA BACTERIANA SI  
POTENTIALA LOR UTILIZARE IN DEZVOLTAREA DE NOI STRATEGII  
ANTIMICROBIENE**

Sinteza lucrarilor 2007-2010

### **Introducere**

In prezenta propunere de proiect a fost abordat studiul unor mecanisme moleculare bacteriene implicate atat in initierea si desfasurarea procesului infectios, cit si in persistenta si supravietuirea acestora in mediul ambiant, mediate de proteinele de soc termic (HSP), inalt conservate de la bacterii pana la om, formand un proteom minimal de stres. Pe baza greutatii moleculare proteinele de soc termic sunt grupate in familii: proteine de soc termic cu greutate moleculara mica, proteine omoloage GroES sau HSP10 (~ 10 kDa), DnaJ-proteine omoloage sau HSP40 (~ 40 kDa), GroEL- proteine omoloage sau HSP60 (~ 60 kDa), proteine omoloage DnaK sau HSP70 (~ 70 kDa), proteine omoloage Hsp90 sau HSP90 (~ 90 kDa), si proteaze dependente ATP Clp (HSP100) (Lindquist and Craig, 1988; Watson, 1990; Lathigra *et al.*, 1991; Shinnick, 1991; Ellis, 1996; Ray, 1999).

Multe din proteinele de soc termic sunt exprimate in mod constitutiv, in conditii fiziologice, iar in conditii de stres sinteza acestora este marita. Inducerea sintezei este foarte rapida. Abilitatea bacteriilor de a produce proteine de soc termic reprezinta o modalitate de adaptare si de supravietuire a bacteriilor in conditii variate, odata cu tranzitul din mediul natural la mediul diferit din organismul gazda. Sinteza acestor proteine este asociata uneori, in cazul bacteriilor patogene, cu o crestere a virulentei acestora.

S-a observat ca proteinele de soc termic produse de bacterii, in special proteinele GroEL, si intr-o mai mica masura proteinele DnaK, sunt foarte imunogene, si pot deveni astfel antigene majore pentru numeroase specii bacteriene patogene, capabile sa induca productia de anticorpi si activarea celulelor T, recunoasterea epitopilor specifici conducand la cresterea imunitatii sau la generarea reactiilor autoimune (Dubois, 1989; Res *et al.*, 1991; Shinnick, 1991; Yamaguchi *et al.*, 1992; 2000), deoarece anticorpii si celulele T activate de aceste proteine de soc termic recunosc, datorita reactivitatii incrucisate, si proteinele Hsp60 si Hsp70 umane, fiind astfel implicate in patologia unor conditii inflamatorii si boli autoimune de tipul diabetului I, boala Crohn, ateroscleroza si artrita cronica juvenila.

Proteinele de soc termic joaca un rol important si in prezentarea altor antigene si in imunitatea tumorală. Vaccinarea soarecilor cu Hsp70, Hsp90, gp96 izolate din celule tumorale murine determina un raspuns imun suficient pentru rejectia si supresarea progresiei tumorilor metastatice. O mai buna cunoastere a functiilor proteinelor de soc termic ar permite asadar utilizarea lor ca agenti terapeutici intr-o serie larga de procese patologice cu etiologie infectioasa.

### **Materiale si metode**

**Tulpini bacteriene testate si conditii de cultivare.** Au fost studiate 38 tulpini de *Vibrio* sp. existente in Colectia de tulpini a Laboratorului *Vibrio* din Institutul Cantacuzino si anume: 5 tulpini de *V. cholerae* serogrup O:1, 5 tulpini de *V. cholerae* serogrup non O:1, 5 tulpini de *V. metschnikovii*, 5 tulpini de *V. parahaemolyticus*, 5 tulpini de *V. alginolyticus*, 3 tulpini de *V. vulnificus*, 5 tulpini de *V. fisherii*, 5 tulpini de *V. anguillarum*. Dintre acestea au fost selectate doua tulpini de *V. parahaemolyticus*, una hemolitica de origine clinica (diaree acuta) (Kanagawa Ppozitiva

(KP) si una nehemolitica izolata din estuarul Deltei Dunarii (Kanagawa Negativa) (KN). Aceste tulpini au fost conservate in bulion lichid cu 10% glicerol la -80°C.

#### **Generarea conditiilor de stres termic si osmotic**

Tulpinile microbiene au fost insamantate in bulion lichid si respectiv bulion lichid 8% NaCl (soc osmotic) si incubate cu agitare (160 rpm) la 37°C si respectiv 42°C (soc termic) timp de 24 de ore.

**Evaluarea cresterii microbiene si numararea celulelor viabile.** Cresterea microbiana a fost determinata prin masurarea absorbantei la 600 nm si numararea coloniilor pe geloza simpla cu 3% NaCl. Celulele bacteriene aflate in faza de crestere logaritmica la 37°C, au fost stresate termic la 42°C, iar dupa aceea toate variantele de lucru au fost supuse inactivarii termice la 47°C in baie de apa pentru 30 de minute. Viabilitatea celulelor bacteriene inainte si dupa expunerea la stres termic si osmotic a fost verificata prin insamintarea de dilutii zecimale pe mediu TCSB si numararea celulelor viabile dupa incubare la 37°C timp de 24 de ore.

**Examinarea morfologica** a fost realizata pe frotiuri colorate Gram realizate din culturi lichide obtinute in conditii de cultivare normale si in diferite conditii de stres.

**Hemolizina Kanagawa cu rol de enterotoxina** a fost evidentiata prin insamantarea tulpinilor testate pe placi cu agar Wagatsuma cu 5% (vol/vol) sange de iepure cu ajutorul unei anse calibrate de unica utilizare. Dupa incubare la 37°C timp de 24 de ore, zonele clare (liza totala a hematiilor) in jurul striului de cultura au fost interpretate ca reactii pozitive.

#### **Evidențierea genei *tdh* prin PCR**

Pentru evidențierea genei *tdh* a fost proiectat un sistem PCR care amplifică un fragment de 270 pb. Primerii au fost desemnați cu ajutorul programului Primer3 disponibil pe Internet ([www.justbio.com](http://www.justbio.com)) (tabelul 1.)

Tabel 1. Primeri utilizați pentru detecția genei *tdh*

Nr. crt.	Denumire primer	Polariate	Secvență(5'-3')	Temperatură de melting
1	tdh F	sens	CGCAACAAAGCCTCATAGAG	58.68
2	tdh R	antisens	ACAATATCTCATCAGAACCGG	56.61

Amplificarea s-a realizat într-un volum de 50μL care conține: 100μM din fiecare dNTP, 100 nM din fiecare primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 U GoTaq Flexi (Promega), 50 mM KCl, 60 ng ADN matriță. Amplificarea termică s-a efectuat cu termocyclerul Corbett Palm Cycler după programul: denaturare inițială (95°C, 2 min), 35 cicluri de amplificare (denaturare 95°C, 30 sec.; hibridizare 53°C, 30sec.; elongare 72°C, 30 sec.), elongare finală (72°C, 5 min.). Ampliconii rezultați au fost migrați în tampon TAE 1X într-un gel de agaroză (2%, 80V). Vizualizarea fragmentelor ADN s-a realizat prin colorare gelului cu bromură de etidiu și expunere la lumină UV. Dimensiunea ampliconilor a fost apreciată prin compararea cu un marker de masă moleculară (100bp, Promega).

**Prepararea fractiilor celulare.** Fractiile celulare totale, extracelulare si periplasmice de *V. parahaemolyticus* au fost examinate pentru continutul de proteine si prezenta de proteine de soc termic. Fractiile celulare totale au fost obtinute prin liza sedimentului intr-un tampon specific cu urmatoarea compozitie per 100 mL: 10 mL de tampon TBS (0.41M Tris, 0.4 M acid boric, 1% sodiu duodecil sulfat (SDS) pH 8.64), 5 g de glucoza, 185 mg de EDTA, 5 ml de 2-mercaptoetanol, 1,9 g de SDS, si 5 ml de glicerol. Fractiile extracelulare au fost obtinute prin centrifugarea culturii, iar supernatantul a fost concentrat de 100 de ori prin ultrafiltrare (Amicon Corp., Lexington, Mass.). Fractiile periplasmice au fost obtinute cu ajutorul metodei Callahan si colab., 1993. Pe scurt, un volum de 40 mL de cultura bacteriana a fost centrifugat iar sedimentul resuspendat in 4 mL tampon

50mM Tris HCl (pH 8,8) la 4 °C la care s-a adaugat 0,8 mL cloroform, si apoi incubare la temperatura camerei timp de 10 minute. Un volum de 8 mL de tampon Tris HCl a fost adaugat, urmat de omogenizare, centrifugare la 16,000 x g timp de 20 de minute si colectarea supernatantului. Contaminarea fractiilor periplasmice si extracelulare cu proteine citoplasmice a fost monitorizata prin determinarea prezentei glucozo-6-fosfat dehidrogenazei citoplasmice cu ajutorul unui kit enzimatic pentru spectrofotometrie (Sigma Co., St. Louis, MO) (Dai si colab., 1992; Taubert si colab., 2000).

**Concentratia proteinelor totale din diferite fractii** a fost determinata cu ajutorul metodei Bradford, utilizand reactiv Pierce.

**Detectatia prezentei HSP in diferite fractii celulare prin imunoblot.** Diferitele fractii celulare obtinute din culturi bacteriene supuse la diferite tipuri de stres au fost ajustate la aceeasi concentratie de proteine. 20µg extract proteic total, din fiecare fractie celulara au fost repartizate pe o membrana de PDVF, dupa care membrana a fost blocata, adaugandu-se anticorpii primari [rabbit anti-GroES-10kD (Sigma-G8909); rabbit anti-GroEL-60kD (Sigma-G6532); mouse monoclonal anti-Heat Shock protein 70 (Sigma-H5147)] peste noapte la 4°C. Fiecare membrana a fost spalata si apoi s-au adaugat anticorpi marcati cu fosfataza alcalina: anticorpi de capra anti-iepura (pentru hsp10 si hsp60) sau anticorpi de capra anti-soarece (pentru hsp70), timp de 30 minute. După o spalare prealabilă, spoturile au fost dezvoltate cu NBT/BCIP.

**Studiul influentei supernatantelor culturilor de *Vibrio parahaemolyticus* asupra culturilor de celule eucariote.** Celulele HeLa si celulele diploide umane au fost cultivate in mediul lichid *Eagle's Minimal Essential Medium (Eagle MEM)* si respectiv DMEM: F12 (1:1) (Sigma) cu 10% ser fetal de vitel (Gibco BRL). Celulele eucariote au fost cultivate in placi de unica utilizare cu 24 de godeuri si utilizate la o confluenta de 80-100%. Monostraturile de celule au fost tratate cu fractii de cultura, ajustate la o concentratie de proteine de 10 µg/ml si incubate timp de 24 de ore. Dupa incubare, supernatantele au fost congelate pentru studii ulterioare, iar monostratul a fost examinat la microscopul inversat (Zeiss) si fotografiat cu o camera Sonny Full HD 1080, 8.1 MegaPixels, Zoom 10X.

**Evaluarea imunogenitatii proteinelor de soc termic - studii *in vivo*.** Au fost utilizati soareci conventionali (holoxenici), *Mus musculus*-Balb/c p distribuiti in loturi de cinci animale. Fractiile celulare totale, extracelulare si periplasmice de culturi de *V. parahaemolyticus* au fost utilizate pentru imunizare prin administrarea i.p. a 0,1 mL, repetata saptamanal timp de 10 saptamani. Dupa imunizare, soarecii au fost infectati cu tulpini salbatice de *V. parahaemolyticus* in scopul observarii efectului imunoprotector determinat de fractia proteica. Soarecii au fost monitorizati timp de 16 zile de la infectare, pentru determinarea ratelor de mortalitate si morbiditate. Monitorizarea evolutiei infectiei s-a realizat prin examinarea zilnica a fiecarui lot precum si prin numararea celulelor viabile realizata pe diferite organe si tesuturi, pentru stabilirea gradului de invazie (plamani, splina, mucoasa intestinala si sange) (Chifiriuc 2007, 2009).

**Evaluarea expresiei factorilor de virulenta solubili.** Suspensiile bacteriene au fost incubate in bulion, respectiv bulion cu 8% NaCl si incubate pentru 24 ore la 37°C, respectiv 42°C. Cite 5 µl au fost insamantati in spot pe diferite medii solide in vederea determinarii factorilor de virulenta: hemolizine, enterotoxina Kanagawa, alte toxine formatoare de pori (lecithinaza, lipaza), proteaze (cazeinaza, gelatinaza), glucidaze (amilaza, mucinaza, hidroloza esculinei, DN-aza).

**Capacitatea de aderență la substrat inert a fost evaluată prin testul producerii de *slime*** (un exopolizaharid hidrofil secretat de unele tulpini care promovează aderența celulelor bacteriene la suprafețe inerte, abiotice, fiind un indicator al gradului de rezistență și al capacității de supraviețuire a tulpinilor bacteriene în mediul extern și poate constitui un factor de virulență, în cazul infecției unui organism gazdă, prin blocarea procesului de fagocitoză), prin metoda cantitativa. Suspensiile bacteriene au fost incubate in bulion, respectiv bulion cu 8% NaCl in placi Elisa cu 96 godeuri si

incubate pentru 48ore la 37<sup>0</sup>C, respectiv 42<sup>0</sup>C. După incubare, godeurile au fost golite de cultura bacteriană, spălate de 3 ori cu TFS (pH=7.2), fixate cu metanol rece 5 min si colorate cu soluție alcoolică de cristal violet 1%,30min. Biofilmul format a fost reluat in suspensie cu acid acetic 33%, iar densitatea suspensiei colorate a fost determinata prin masurarea A 490 nm c ajutorul unui reader ELISA.

**Capacitatea de aderența la substratul celular** reprezentat de linia celulara HeLa s-a realizat prin metoda Cravioto, adaptată. Celulele HeLa au fost cultivate 24h la 37<sup>0</sup>C în MEM (Eagle MEM-Minimal Essential Medium) cu adaos de 10% ser fetal bovin (Gibco BRL), 0.1mM aminoacizi (Gibco BRL) și 0.5ml soluție de gentamicină (50 μg/ml) (Gibco BRL). Monostraturile de celule HeLa obținute în plăci de plastic cu șase godeuri au fost spălate de trei ori cu TFS ( Tampon Fosfat Salin), si s-au adaugat 2 ml de suspensie bacteriană în fiecare godeu. Plăcile astfel inoculate au fost incubate 2h la 37<sup>0</sup>C. După incubare monostraturile au fost spălate 3 ori cu TFS, fixate cu metanol rece -5 min. și colorate cu soluție Giemsa (1:20) (Merck, Darmstadt, Germania) -30 min. Plăcile au fost spălate, uscate la temperatura camerei, examinate la microscop (mărire x 2500) cu obiectivul de imersie pentru determinarea semicantitativă a ratei de aderență și respectiv a *pattern*-ului de aderență și fotografiate cu o cameră tip Contax adaptată la microsop Zeiss (Cravioto et al., 1979).

#### **Inducerea secreției de citochine de către fracțiile proteice celulare**

Pentru studiul modelării profilului citochinic de către proteinele extrase din *Vibrio parahaemolyticus* după expunerea la stresului termic și osmotic s-au ales două modele celulare: linia HeLa și celulele diploide umane. Au fost analizate efectele induse de tratamentul cu extracte proteice totale, periplasmice și din supernatantul de cultură în expresia IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 și TNF. Inducerea secreției de citochine s-a realizat prin incubarea culturilor în monostrat de HeLa și de celule diploide umane (DU) cu fracțiile proteice periplasmice, din supernatant și din lizatul celular total timp de 24 de ore. Din supernatantul culturilor de celule eucariote s-au dozat citochinele cu ajutorul truselor ELISA Mabtech conform instrucțiunilor producătorului.

#### **Investigarea nivelului proteinelor Hsp60 si Hsp70 in circulatia sangvina si a anticorpilor specifici acestor proteine**

**Pacienti:** 20 pacienti cu boli cardiovasculare (dintre care 10 cu hemoculturi pozitive cu *Staphylococcus sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Candida sp.* si 10 pacienti cu infectii localizate si boli cardiovasculare de fond), 5 pacienti cu hemoculturi pozitive fara boli cardiovasculare asociate; 7 pacienti cu infectii localizate fara afectiuni cardiovasculare; 10 pacienti cu cancer laringo-faringiene; 5 pacienti veniti in urgenta fara afectiuni de fond; 10 pacienti veniti in urgenta cu afectiuni de fond (infectii cronice cu virus hepatitic B sau C, pielonefrita, HTA, fibrilatie cronica, etc), 11 pacienti cu peritonita (3 pacienti cu apendicita acuta perforata; 4 pacienti cu peritonită prin ulcer perforat, 4 pacienti cu peritonita prin perforatie cliostatica de tumora).

**Detectia nivelului de anticorpi specifici anti HSP 60 si anti-HSP 70 in ser** - au fost utilizate kit-rile comerciale anti-Hsp60 Ig G/A/M si anti-Hsp70 Ig G/A/M ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) de la Enzo Life Sciences, USA, ([www.enzolifesciences.com](http://www.enzolifesciences.com)).

#### **Analizele statistice**

Analiza datelor s-a realizat utilizand soft-ul GraphPad,c are realizeaza modele logistice de regresie multivariata. Alte analize s-au bazat pe testul chi-pătrat și Student t-test. Nivelul de semnificatie a fost considerat cand p<0,05 sau p<0,01.

#### **Rezultate si discutii**

Desi proteinele de soc termic sunt conservate la un numar mare de organisme (atat procariote, cat si eucariote), recent studiile s-au orientat catre investigarea rolului proteinelor de soc termic in controlul patologiei bolilor si in supravietuirea si virulenta bacteriilor patogene.

Multi patogeni au doua faze distincte in ciclul de viata: una se desfasoara in organismul gazda infectat, iar cealalta asigura persistenta si multiplicarea agentului patogen in mediul natural. Modificarea parametrilor din mediu duce la o modificare in expresia genelor. In mediul acvatic, bacteriile trebuie sa faca fata unor variatii ale parametrilor fizico-chimici. La ingerarea in organismul uman, trebuie sa tolereze un pH scazut, o temperatura crescuta, activitatea diferitelor proteaze intestinale, fapt care stimuleaza profund expresia genelor bacteriilor in sensul combaterii acestor stimuli stresanti.

Dintre acesti stimuli, temperatura joaca un rol crucial in cresterea si supravietuirea bacteriilor. Mai mult s-a observat o corelatie intre aparitia cazurilor de boli cu transmitere hidrica (ex. Holera) si ciclul anual al temperaturii apei

Bacteriile enterice experimenteaza 2 faze diferite in ciclul lor de viata: 1) in mediul natural si 2) in organismul gazda. La trecerea dintr-o faza in alta, bacteriile sufera modificari substantiale si dezvolta o serie de mecanisme de adaptare, ce duc in final la modificari ale expresiei genice.

Intr-o prima faza a proiectului, am elaborat si optimizat modelul experimental bacterian, reprezentat de doua tulpini de *Vibrio parahaemolyticus*, care au fost selectate dintr-un numar total de 38 de tulpini de *Vibrionaceae*, provenite din colectia INCDMI Cantacuzino, Laborator Holera, apartinand speciilor *Vibrio cholerae*, *V. metschnikovii*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus* si *V. fischerii*, izolate atata din cazuri de diaree acuta si infectii extraintestinale, cat si din mediul acvatic.

Criteriile de selectie au fost reprezentate de: modul de viata bifazic, reprezentat de mediul acvatic si organismul uman, abilitatea de a produce factori de virulenta si patogenitate, variatia expresiei factorilor de virulenta si patogenitate in functie de temperatura de incubare.

A fost selectata o tulpina de *V. parahaemolyticus* Kanagawa-pozitiva, izolata dintr-un caz de boala diareica si una Kanagawa-negativa, izolata din mediul acvatic.

*V. parahaemolyticus*, este o specie bacteriana larg raspandita in mediile acvatice naturale din intreaga lume, inclusiv in Delta Dunarii si este in acelasi timp si un foarte bine cunoscut agent patogen al toxiinfectiilor alimentare. Incidenta crescuta a acestui patogen se datoreaza, fara indoiala, consumului de fructe de mare in Taiwan, Japonia si alte tari din Asia Pacifica (Wong si colab., 2002). Manifestarile clinice ale infectiei cu acest agent patogen sunt: diaree, crampe abdominale, stari de greata si vomă, dureri de cap, febra si frisoane, perioada de incubare variind de la 4 la 96 de ore (Joseph si colab, 1983). Majoritatea izolatelor clinice sunt hemolitice pe mediu Wagatsuma agar (tulpini Kanagawa-pozitive, KP+) si produc o hemolizina directa termostabila (TDH), care reprezinta un factor major de virulenta la aceasta specie patogena (Takeda si colab., 1983). In timp ce peste 95% din izolatele clinice de *V. parahaemolyticus* sunt Kanagawa-pozitive, producand hemoliza pe mediul de cultura Wagatsuma cu adaos de sange uman sau de iepure, majoritatea izolatelor din mediu sunt Kanagawa-negative (Miyamoto, 1969; Chowdhury si colab., 1990).

*Vibrio parahaemolyticus*, in mod similar cu alte specii de *Vibrio* intalneste, in mod obisnuit, diferite conditii adverse in mediul natural sau in mediile de procesare a alimentelor, stresul determinat de aceste conditii putind afecta supravietuirea acestui patogen si astfel modifica riscurile legate de igiena alimentara (Wong si colab, 2002).

Tulpinile de *Vibrio parahaemolyticus* selectate au prezentat in conditii de stres termic o rata de crestere si multiplicare crescuta, aderența scazuta la substrat celular si crescuta la substrat inert, amilaza expresie crescuta, in timp ce cazeinaza, hidroliza esculinei, lecitinaza au prezentat expresie scazuta la temperatura ridicata de incubare). Aceste rezultate au demonstrat faptul ca tulpinile de *Vibrionaceae* prezinta capacitatea de a se adapta la conditii nefavorabile si de a-si conserva potentialul de virulenta si patogenitate, chiar si la temperatura de 4 °C. Anumiti factori de virulenta au fost exprimati de tulpinile selectate exclusiv la 37 °C, ceea ce demonstreaza asocierea acestora cu patogeniza la animalele homeoterme.

Capacitatea scazuta de aderenta la substratul inert in conditii de stres confirma datele din literatură conform cărora, tulpinile de *Vibrio* prezintă o strategie particulară de supraviețuire – bacteriile sunt capabile să intre într-o stare dormandă, în care acestea deși sunt viabile, nu pot fi cultivabile pe medii, așa-numită stare VBNC (*viable but non-cultivable*). În această stare capacitatea lor de colonizare este redusă, dar bacteriile reușesc să supraviețuiască și să-și păstreze potențialul infecțios până la apariția unor condiții favorabile de mediu.

O altă strategie de supraviețuire a bacteriilor patogene o constituie dezvoltarea biofilmelor. Acesta poate explica capacitatea mai crescută de aderenta la substratul inert în toate cele 3 condiții de stres față de martor, probabil prin formarea de biofilme pe diferite substraturi.

În a doua etapă a proiectului, am urmărit investigarea influenței factorilor de mediu fizico-chimici asupra creșterii microbiene și a expresiei proteinelor de soc termic produse de culturile de *V. parahaemolyticus*, demonstrându-se faptul că stresul termic și osmotic au influențat diferit expresia proteinelor, în sensul că în condiții de soc termic a crescut expresia proteinelor solubile, pe când stresul osmotic a crescut expresia proteinelor asociate cu celula bacteriană. *Pattern*-ul proteinelor de soc termic sintetizate a fost diferit în funcție de sursa de izolare a tulpinilor analizate (boala diareică vs apă salmastră), virulența tulpinilor (tulpini hemolitice vs nehemolitice) și fracția celulară analizată (extract periplasmic, supernatant, extract celular total). Studiile noastre de imunoblotting confirmate prin western blot utilizând anticorpi monoclonali anti-GroES (omolog 10kDa), anti Gro-EL (omolog 60 kDa) și anti DnaJ (omolog 70kDa) au demonstrat prezența proteinelor de soc termic de 10 kDa (GroES), 60 kDa (Gro-EL) și 70 kDa (DnaJ).

GroEL (60 kDa) a fost exprimată, indiferent de tipul de condiții experimentale (în prezența sau absența stresului termic sau osmotic), în supernatantele analizate, în timp ce în extractul periplasmic și lizatul celular expresia proteinei GroEL a fost mărită în cazul tulpinilor supuse stresului termic și stresului simultan, termic și osmotic. În supernatantele bacteriene, indiferent de condițiile de incubare, expresia proteinei DnaJ (70 kDa) a fost superioară expresiei de Gro-ES (10 kDa), nivelul proteinelor de soc termic fiind mai ridicat la tulpina nehemolitică, izolată din mediul ambiant. În fracția periplasmică, expresia DnaJ a fost de asemenea superioară expresiei proteinei GroEL. La tulpina KN, proteina GroEL a fost exprimată numai în cazul socului termic și socului simultan termic și osmotic, în timp ce DnaJ a fost exprimată atât în cazul socului termic, cât și osmotic. În lizatul celular, atât GroEL, cât și DnaJ au fost exprimate preferențial de tulpina KN în cazul socului termic și socului simultan termic și osmotic.

Stresul osmotic a determinat modificări importante la nivelul morfologiei celulare, lucru demonstrat prin apariția de forme fusiforme, spiralate cu o afinitate scăzută pentru colorația Gram în contrast cu morfologia normală de bacili Gram-negativi frecvent grupați în palisadă observată în cazul tulpinii cultivate la 37°C. În schimb, stresul termic nu a influențat în mod semnificativ morfologia celulelor, însă s-a observat o predominanță a bacililor izolați, negrupați în palisade.

În privința influenței supernatantelor culturilor bacteriene supuse la diferite condiții de stres asupra celulelor eucariote, monostraturile de celule embrionare au fost drastic afectate de toate supernatantele testate, în timp ce celulele HeLa au fost afectate în special de supernatantele obținute din culturile supuse socului osmotic și numai slab afectate de supernatantele obținute din culturile supuse stresului termic. Modificările de la nivelul monostratului au constat în desprinderea celulelor de monostrat, inducerea apoptozei și apariția celulelor picnotice.

Utilizând un model experimental animal, s-a observat de asemenea că soarecii reușesc să se adapteze și să supraviețuiască în urma infectării cu tulpini de *Vibrio* supuse unor temperaturi crescute (rata de supraviețuire - 100%) dar nu și în urma tratării cu tulpini de *Vibrio* crescute în condiții de stress osmotic (doar 25% rata de supraviețuire). Mai mult, în condiții extrem de stresante, reprezentate atât de stress termic, cât și de stress osmotic supraviețuirea este complet abolită.

Deși sinteza de hemolizine directe termostabile, factorul major de virulență al speciei *V. parahaemolyticus* nu a fost influențată de salinitatea marită sau de temperatură de 42°C, totuși exprimarea caracterului hemolitic a fost mai intensă în cazul celulelor ramase viabile după inactivarea termică la 47°C, fapt ce demonstrează riscul conservării virulenței tulpinilor de *Vibrio parahaemolyticus* în alimente insuficient tratate termic.

Imunizarea animalelor de laborator cu diferite fracții celulare a demonstrat că fracția de supernatant de cultură tratată termic (42°C) sau supusă simultan socului termic și osmotic (42°C, 8%NaCl) a condus la generarea unui titru crescut de anticorpi anti-DnaJ (hsp 70).

Deși titrurile de anticorpi anti-proteine de soc termic au variat în funcție de lotul analizat, imunizarea cu supernatant și extract celular total a avut un rol protector față de infecția cu tulpini virulente, Kanagawa pozitive de *Vibrio parahemolyticus*, animalele infectate rămânând viabile.

Deși protecția încrucișată la diferiți factori de stres este un fenomen recunoscut și demonstrat la patogenii enterici, studiul nostru a demonstrat că în cazul speciei *V. parahaemolyticus* nu există protecție încrucișată între stresul termic și cel osmotic.

Proteinele din fracțiile periplasmice și din supernatantele celor două tulpini bacteriene cultivate în toate variantele de lucru au determinat creșterea nivelului de TNF sintetizat de celulele diploide umane, în timp ce extractul proteic total a inhibat expresia TNF. Aceste rezultate s-ar putea datora faptului că fracțiile P și SN au fost concentrate în HSP (prin ultrafiltrare), spre deosebire de lizatul celular utilizat ca atare. Aceste rezultate ar putea sugera o relație doză-efect între concentrația de HSP și nivelul de expresie al TNF. Expresia IL-1 nu a fost indusă de niciuna din fracțiile proteice analizate indiferent de tulpină și de stresul aplicat (termic, osmotic, termic și osmotic). Secreția de IL-6 a fost indusă de proteinele periplasmice izolate de la ambele tulpini în aproape toate condițiile de cultivare, cu excepția incubării la 37°C a tulpinii patogene, ceea ce sugerează că inhibarea producerii de IL-6 poate favoriza instalarea procesului infecțios prin inhibarea răspunsului proinflamator amorsat de această IL. Deși cele două tipuri de celule eucariote utilizate exprimă IL-6 nestimulate, se observă o creștere a concentrației acestor interleuchine după stimularea cu fracția periplasmică sau cu extractul total obținut după supunerea la stres termic sau la dublul stress termic/osmotic. În ceea ce privește celulele diploide umane, fracția periplasmică a stimulat în general producerea de IL-6, iar lizatul total al tulpinii patogene supuse stresului termic a indus cel mai înalt nivel de expresie al acestei IL, aspect care sugerează faptul că tratarea termică insuficientă a produselor contaminate cu *Vibrio parahaemolyticus* poate induce manifestări clinice, care au la bază, pe lângă componenta enterotoxigenă și declanșarea unei cascade proinflamatorii. Comportamentul celor două tipuri celulare studiate este aproape identic în ceea ce privește secreția de IL-6.

S-a observat o intensificare a sintezei de TNF la celulele HeLa stimulate cu proteine periplasmice produse în toate variantele de lucru la tulpina patogenă (unde nivelul de expresie a fost foarte ridicat). Proteinele din supernatantul de cultură al tulpinii nepatogene au determinat creșterea nivelului de TNF în cazul tulpinii nepatogene cultivate la 37 °C și 42 °C.

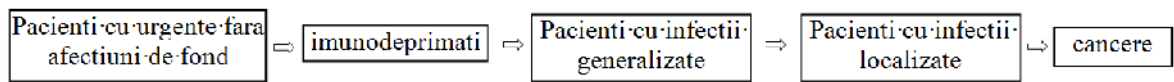
Stimularea expresiei celor două citochine proinflamatorii IL-6 și TNF este corelată cantitativ cu nivelul HSP 60 în SN și P. În ceea ce privește extractul total, nivelul de expresie al IL-6 este corelat cu nivelul GroES și DNAJ.

Secreția de IL-2 a fost indusă la celule HeLa de către fracțiile proteice periplasmice, din supernatant și extractul total izolate din tulpina patogenă supusă stresului termic (fracție periplasmică și supernatant), osmotic (supernatant) și stresului combinat termic/osmotic (supernatant). Proteinele izolate din tulpina nepatogenă induc secreția de IL-2 numai în condiții de stres termic. Profilul IL-2 al celulelor diploide umane este diferit, această citochină fiind indusă de proteinele din supernatantele de cultură ale ambelor tulpini, nesupuse vreunei forme de stres. De asemenea IL-2 este secretată după tratamentul cu proteinele extrase din supernatantul de cultură al tulpinii patogene supusă stresului osmotic. IL-4 a fost secretată de celulele HeLa stimulate cu proteine periplasmice extrase

din tulpina patogenă expusă la stres termic și osmotic. Celule diploide umane au exprimat IL-4 după stimularea cu proteine periplasmice și supernatant provenite de la tulpina nepatogenă supusă șocului termic ceea ce se corelează cu nivelul mai ridicat de expresie al GroES în aceste fracții tratate în condiții similare.

Cuantificarea proteinelor de soc termic in serul pacientilor cu infectii bacteriene si diverse afectiuni de fond a aratat că atât nivelul Hsp60, cât și al Hsp70 sunt semnificativ crescut la pacienti cu cancer (atât în cancerele laringo-faringiene cât și gastrice) fiind probabil asociat citolizei celulare, ceea ce conduce la creșterea nivelului plasmatic al acestora. De asemenea, nivel crescut al proteinelor de soc termic a fost identificat la pacienții septicemici și intubati, cu afectiuni cardiovasculare sau poliartrita reumatoida.

De asemenea s-a observat creșterea semnificativa a titrului anticorpilor anti-Hsp60 la lotul de pacienti cu cancer (P=0,002; Kruskal-Wallis test, Gaussian Approximation). Tendința de creștere a titrului anti-Hsp60 la loturile studiate este următoarea:



Proportile nu se pastreaza in cazul anti-Hsp70 (p=0,4671), titrul fiind crescut la aproape toate loturile de pacienti, și ușor scăzute la pacienții cu infectii localizate (figura 1).

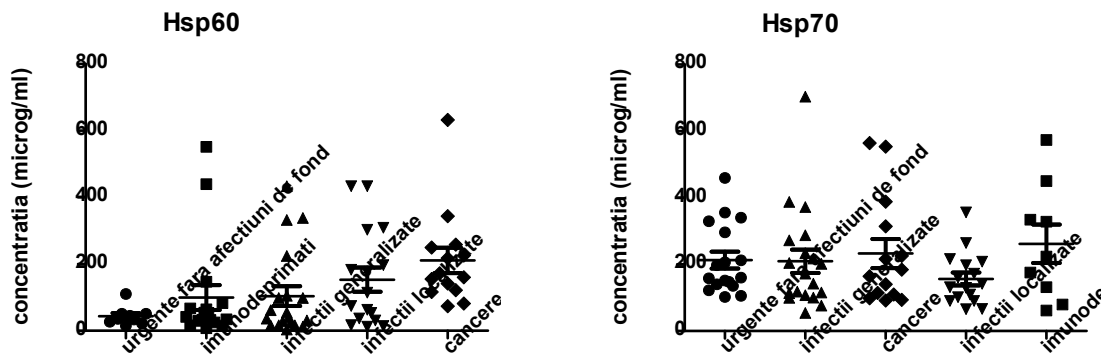


Fig. 1. Reprezentarea grafica a valorilor titrului de anticorpi anti-Hsp60 (stanga) și anti-Hsp70 (dreapta) în funcție de tipul de patologie .

Interesant a fost faptul că, la stratificarea după etiologia infecției, s-a remarcat creșterea semnificativa a titrului anticorpilor anti-HSP 60 la pacienții cu infectii produse de bacterii Gram-negative.



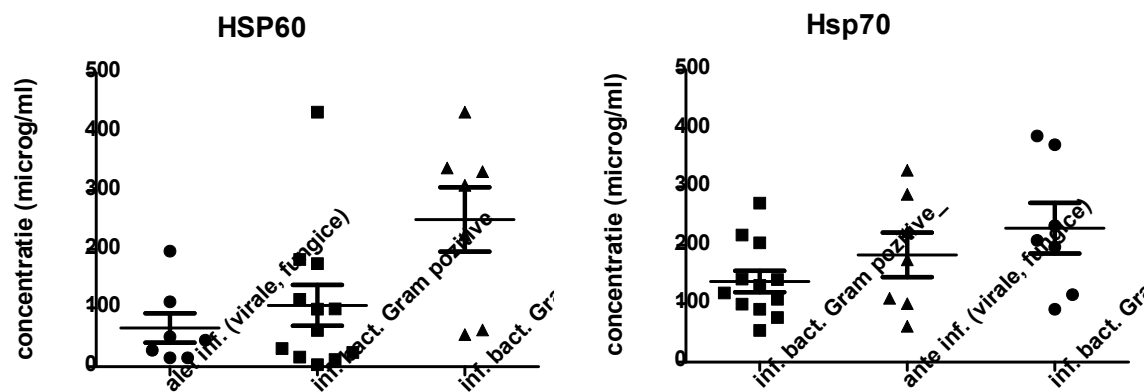


Fig. 2. Reprezentarea grafica a valorilor titrului de anticorpi anti-Hsp60 (stanga) si anti-Hsp70 (dreapta) in functie de etiologia infectioasa.

## Concluzii

Acest studiu a demonstrat inducerea termotoleranței la tulpinile de *Vibrio parahaemolyticus* supuse șocului termic sub-letal, probabil prin declanșarea mecanismului de adaptare la stres, evidențiat prin sinteza de proteine de șoc termic de tip Gro-ES, Gro-EL și DnaJ.

Patternul proteinelor de șoc termic sintetizate a fost diferit în funcție de sursa de izolare a tulpinilor analizate (boala diareică vs apa salmastră), virulența tulpinilor (tulpini hemolitice vs nehemolitice) și fracția celulară analizată (extract periplasmic, supernatant, extract celular total).

Prin tehnica PCR s-a evidențiat existența genei *tdh*, determinantul genetic al principalului factor de patogenitate, enterotoxina Kanagawa, la tulpina diareigenă.

Exprimarea caracterului hemolitic a fost mai intensă în cazul celulelor rămase viabile după inactivarea termică la 47°C, fapt ce demonstrează riscul conservării virulenței tulpinilor de *Vibrio parahaemolyticus* în alimente insuficient tratate termic.

GroEL (60 kDa) a fost exprimată, indiferent de tipul de condiții experimentale (în prezența sau absența stresului termic sau osmotic), în toate fracțiile celulare analizate, ceea ce demonstrează expresia constitutivă a acestei proteine la tulpinile analizate.

În supernatantele bacteriene, indiferent de condițiile de incubare, expresia proteinei DnaK (70 kDa) este superioară expresiei de Gro-ES (10 kDa), nivelul proteinelor de șoc termic fiind mai ridicat la tulpina nehemolitică, izolată din mediul ambiant.

Deși protecția încrucișată la diferiți factori de stres este un fenomen recunoscut și demonstrat la patogenii enterici, studiul a demonstrat că în cazul speciei *Vibrio parahaemolyticus* nu există protecție încrucișată între stresul termic și cel osmotic.

Analiza profilului citochinic a doua linii celulare stimulate cu diferite fracții bacteriene a demonstrat faptul că stresul termic și osmotic determină acumularea în diferite fracții de cultură (în special în fracția periplasmică și supernatant) a unor componente capabile să moduleze expresia citochinelor pro- și anti-inflamatorii, inducând un răspuns proinflamator mai intens decât în condiții

optime, substanțializat prin creșterea expresiei de IL-6 și TNF-alpha, balansat însă prin stimularea expresiei citochinei antiinflamatorii IL-4.

Atat nivelul HSP60, cat si al HSP70 sunt semnificativ crescute la pacienti cu cancere, probabil datorita citolizei celulare, care conduce la cresterea nivelului plasmatic al acestora, la pacientii septicemici si intubati, cu afectiuni cardiovasculare sau poliartrita reumatoida. Nivelul anticorpilor anti-HSP 60 kda a fost observat la pacientii cu cancere si cu infectii localizate si generalizate. Titrul anticorpilor anti-HSP70 a fost crescut la aproape toate loturile de pacienti, si usor scazut la pacientii cu infectii localizate. Titrul anticorpilor anti-HSP 60kDa este foarte ridicat in infectiile cu bacterii Gram-negative. Astfel, titrul crescut al anticorpilor anti-HSP 60Kda poate reprezenta un marker de diagnostic specific pentru infectiile cu bacterii Gram-negative, localizate sau generalizate.

Rezultatele obtinute in cadrul acestui proiect ne-au permis aprecierea importantei proteinelor de soc termic (HSP) in mentinerea si exprimarea potentialului de patogenitate si virulenta al tulpinilor microbiene in conditii nefavorabile, respectiv a anticorpilor fata de proteinele de soc termic ca markeri pentru diagnosticul si prognosticul patologiilor infectioase.

Rezultatele obtinute au contribuit la formarea de tineri cercetatori, facand obiectul unei teze de licenta sustinuta in 2008 (Pircalabioru Gratiela, Fac. de Biologie, Specializarea Biochimie), al unei teze de disertatie sustinuta in 2010 (Sorin Dinu, Fac. de Biologie, Master de Genetica si Microbiologie, si al tezei de doctorat a trei Beatrice Gilea (Scoala doctorala -Fac. de Biologie, inmatriculata in 2008).

In cadrul prezentului proiect au fost introduse in activitatea Lab. de Microbiologie al Facultatii de Biologie o serie de metode noi, vizind procedee de extractie a diferitelor fractii de cultura bacteriana, caracterizarea imunologica a proteinelor de soc termic, studii de patologie experimentală pentru evaluarea imunogenitatii proteinelor de soc termic si de determinare a titrului anticorpilor anti-HSP.

## Bibliografie selectiva

1. Callahan, S.M., N.W. Cornell, and P.V. Dunlap. 1995. *Purification and properties of periplasmic 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. A novel zinc-containing enzyme from the marine symbiotic bacterium Vibrio fischeri.* J. Biol. Chem. 270:17627-17632.
2. Cravioto A., R.J. Gross, S.M. Scotland and B. Rowe. 1979. *An adhesive factor found in strains of Escherichia coli belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes.* Curr. Microbiol 3: 95-99
3. Chifiriuc C., Bleotu C, Ditu L.M., Smarandache D., Săsărman E., Banu O., Drăcea O., Larion C., Lazăr V. 2009. *In vivo experimental model for the study of the influence of subinhibitory concentrations of phenyllactic acid on Staphylococcus aureus pathogenicity.* Roum. Arch. Microbiol. Immunol.68 (1): 18-21
4. Chifiriuc C., Lazar V., Dracea O., Ditu, L.M., Smarandache D., Bucur M., Larion C., Cernat R., Sasarman E. 2007. *Drastic Attenuation of Pseudomonas aeruginosa Pathogenicity in a Holoxenic Mouse Experimental Model Induced by Subinhibitory Concentrations of Phenyllactic acid (PLA) Produced by Lactic Acid Bacteria,* Int. J. Mol. Sci. 8, 583-592.
5. Chowdhury, M. A. R., H. Yamahaka, S. Miyoshi, Shinoda S. 1990. *Ecology and seasonal distribution of Vibrio parahaemolyticus in aquatic environments of a temperate region.* FEMS Microbiol. Ecol. 74:1-10.
6. Dai, J.W., Y.S. Lee, and H.C. Wong. 1992. *Effects of iron limitation of production of a siderophore, outer membrane proteins, and hemolysin and on hydrophobicity, cell adherence, and lethality for mice of Vibrio parahaemolyticus.* Infect. Immun. 60:2952-2956
7. Dubois P. 1989. *Heat shock proteins and immunity.* Res Immunol 140:653-659

8. Ellis RJ. 1996. *Stress proteins as molecular chaperones*. In: *Stress proteins in medicine*. van Eden W, Young DB, editors. New York: Marcel Dekker Inc., pp. 1–26.
9. Joseph, S.W., R.R. Colwell, and J.B. Kaper. 1983. *Vibrio parahaemolyticus and related halophilic vibrios*. CRC Crit. Rev. Microbiol. 10:77-123.
10. Lathigra RB, Butcher PD, Garbe TR, Young DB. 1991. *Heat shock proteins as virulence factors of pathogens*. Curr Top Microbiol Immunol 167:125–143
11. Lindquist S, Craig SE. 1988. *The heat shock proteins*. Annu Rev Genet 22:631–677.
12. Miyamoto, Y., T. Kato, Y. Obara, S. Akiyama, K. Takizawa, Yamai S. 1969. *In vitro hemolytic characteristic of Vibrio parahaemolyticus: its close correlation with human pathogenicity*. J. Bacteriol. 100:1147–1149.
13. Res PCM, Thole JER, De Vries RRP. 1991. *Heat shock proteins in immunopathology*. Curr Opin Immunol 3:924–929.
14. Takeda, Y. 1983. *Thermostable direct hemolysin of Vibrio parahaemolyticus*. Pharm. Therapy 19:123-146.
15. Taubert, J., U. Krings, and R.G. Berger. 2000. *A comparative study on the disintegration of filamentous fungi*. J. Microbiol. Methods 42: 225-232.
16. Wolf, P., Oliver, J. D. 1992. *Temperature effects on the viable but nonculturable state of Vibrio vulnificus*. FEMS Microbiol. Ecol. 101:33–39.
17. Wong H.C., Peng P.Y., Lan S.L., Chen Y.C., Lu K.H., Shen C.T., Lan S.F. 2002. *Effects of Heat Shock on the Thermotolerance, Protein Composition, and Toxin Production of Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Food Protection. 65, 3 (1): 499-507(9)
18. Yamaguchi H, Osaki T, Kai M, Taguchi H, Kamiya S. 2000. *Immune response against a cross-reactive epitope on the heat shock protein 60 homologue of Helicobacter pylori*. Infect Immun 68:3448–3454
19. Yamaguchi H, Yamamoto T, Konoeda H, Taguchi H, Ogata S. 1992. *Epitope homology between bacterial heat shock protein and self-proteins in the host cell*. APMIS 100:957–962
20. Yamazaki K, Ohsawa Y, Tabeta K, Ito H, Ueki K, Oda T, et al. 2002. *Accumulation of human heat shock protein 60-reactive T cells in the gingival tissues of periodontitis patients*. Infect Immun 70:2492–2501.
21. [www.justbio.com](http://www.justbio.com)
22. [www.enzolifesciences.com](http://www.enzolifesciences.com)