پژوهنده (مجله پژوهشي دانشگاه علوم پزشكي شهيد بهشتي)
سال دوازدهم, شماره ۶ , پي در پي ۶۰ ، صفحات ۵۱۳ تا ۵۱۹
بهمن و اسفند ۱۳۸۶

تاريخ دريافت مقاله ۸۵/۷/۱۵
تاريخ تجديد نظر ۸۶/۴/۱۹
تاريخ پذيرش مقاله ۸۶/۵/۲۱

بررسي مولكولي ژن توليد كننده پروتئين فاز گرمايي ۶۰ كيلو دالتوني در قارچ بيماري زاي ميكروسپوروم كنيس

دكتر كاميار متواضع[۱] ، آريو جهانگيرنژاد[۲] * ، دكتر مسعود امامي[۳] ، ديويد ياشارال[۴] ، دكتر ساسان رضائي [۵]

چكيده

سابقه و هدف: *پروتئين هاي شوك گرمائي (Heat Shock Proteins يا به اختصار HSPs) به عنوان Chaperone هاي مولكولي عمل كرده و از طريق تنظيم تا خوردگي و انتقال درون سلولي پروتئين هاي تازه سنتز شده، سلول را در مقابل صدمات ناشي از استرس هاي محيطي، محافظت مي كنند. اين مطالعه با هدف مشخص كردن ژن HSP60 در درماتوفيت پاتوژن ميكروسپوروم كانيس انجام شد*

مواد و روش ها: *نمونه قارچ ميكروسپوروم كانيس از بيماران مبتلا به درماتوفيتوزيس جمع آوري گرديده و در شرايط مناسب كشت داده شد. DNA با وزن ملكولي سنگين كه از توده ميسليومي به دست آمد، با روش هاي استاندارد جدا شد. جفت پرايمرهايي با ۲۱ نوكلئوتيد از نواحي حفاظت شده (highly conserved) از ژن هاي HSP60 ساير سلول هاي يوكاريوت، طراحي شد. پرايمرهاي ذكر شده به وسيله ي DNA ژنومي (template) جدا شده از ميكروسپوروم كانيس در PCR مورد استفاده قرار گرفت. مولكول هاي پيش بيني شده، تقويت شدند و براي تعيين سكانس فرستاده شدند.*

يافته ها: *توالي نوكلئوتيدي ژن HSP60 به دست آمده شامل ۱۵۵۰ نوكلئوتيد است كه پروتئيني با ۴۹۷ آمينواسيد را رمز مي نمايد.*

نتيجه گيري: *در مطالعه حاضر، ما هويت و خصوصيت مولكولي يک ژن از ميكروسپوروم كنيس كه كدكننده يک پروتئين متعلق به خانواده ي پروتئين شوک حرارتي ۶۰ كيلو دالتوني ملقب به McHSP60 مي باشد را بررسي كرده ايم. آناليز سكانس آمينواسيدي اين ژن شباهت قابل توجهي با HSP60 ساير يوكاريوت ها نشان مي دهد، چنان كه بيش از ۹۷% با C.immitis ، ۹۲% با Aspergillus fumigatus و ۷۴% با S.cerevisiae همولوژي دارد. تجزيه و تحليل تركيب آمينواسيدي در HSP60 بيانگر غني بودن آن از آلانين، گلوتاميک اسيد و گلايسين است. تركيب آمينواسيدي McHSP60 نشان دهنده ناچيز بودن مقدار سيستئين و تريپتوفان در آن مي باشد*

واژگان كليدي: *درماتوفيت ، ميكروسپوروم كانيس ، **PCR** ، كاپرون ، **HSP***

مقدمه

موجودات زنده، چه پر سلولي و چه تک سلولي به طور مستقيم يا غير مستقيم در ارتباط با عوامل محيطي مي باشند و هنگامي كه تحت تأثير استرس هاي محيطي قرار مي گيرند بايد بتوانند به گونه اي اين تنش ها را تحمل كنند. استرس هاي محيطي از قبيل اشعه ماوراء بنفش (۱) و يا شوک هاي حرارتي و املاح فلزات سنگين (۲)، در اغلب موجودات زنده، اعم از يوكاريوتي و پروكاريوتي، ژن هاي شوک گرمائي را فعال مي كند كه باعث توليد HSP مي شود (۳ و۴).

۱ * . نويسنده مسؤول: استاديار، گروه ميكروبيولوژي ، دانشكده علوم پايه ، دانشگاه آزاد اسلامي واحد تهران شمال . آدرس براي مكاتبه: تهران، ميدان قدس، خيابان دربند، دانشگاه آزاد اسلامي واحد تهران شمال، دانشكده علوم پايه. تلفن: ۰۹۱۲۱۷۲۱۰۱۴ . پست الكترونيک: **ajahangirnejad@yahoo.com**
۲ . كارشناس ارشد ميكروبيولوژي ، دانشكده علوم پايه ، دانشگاه آزاد اسلامي واحد تهران شمال
۳ . استاد گروه ميكروبيولوژي ، دانشكده علوم پايه ، دانشگاه آزاد اسلامي واحد تهران شمال
٤ . كارشناس ارشد ميكروبيولوژي ، دانشكده علوم پايه ، دانشگاه آزاد اسلامي واحد تهران شمال
۵ . استاديار، گروه قارچ شناسي و انگل شناسي ، دانشكده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشكي تهران

واكنـش هاي متـقابل پروتئين هاي شوک حرارتي با پروتئين هاي ديگر سلولي، تا خوردن مناسب پروتئين هاي هدف و انتقال آن ها را به درون اندامک هاي سلولي تسهيـل مي كند (۵).

به دليل تأثير آن ها بر روي كنـفورماسيـون پروتئين هاي ديگر، HSP ها را تحت عنوان كاپرون (Chaperone) مولكولي ناميده اند (۲و۵) . اين پروتئين ها علاوه بر نقش كاپروني، سلول را در مقابل آسيب هاي ناشي از استرس هاي محيطي محافـظت مي كننـد (۳ و ۵ و ۶). مهم ترين نقش HSP هاي ۶۰ كيلو دالتوني، كمک به تاخوردگي پروتئيـن هاي تازه انتقال يافته بوده و اين عمل چه در شرايط طبيعي و چه تنش محيطي، وابسته به ATP مي باشد (۷). اين گروه از HSP ها در انتقال پروتئين هاي سيتوپلاسمي به داخل ميتوكندري نيز نقش دارند (۸ و ۹).

درماتوفيت ها گروهي از قارچ هاي رشته اي كراتينوفيليک هستند كه پوست و ضمائم پوستي را در انسان و حيوانات مورد حمله قرار مي دهنـد (۱۰). ميـكروسپـوروم كانيس درماتوفيت حيوان دوست است كه در سگ و گربه و به ندرت اسب و ميمون ايجاد بيماري مي كند. در انسان اين قارچ باعث كچلي ريش و سبيل، بدن، ناخن و سر مي شود. كچلي مو در انسان به صورت اسپور خارج مويي (اكتوتريكس) مشاهده مي شود، هر چند اين قارچ به پوست بدون مو نيز حمله مي كند (۱۱).

با توجه به اين كه در زمينه ژنتيک مولكولي، تحقيقات نسبتاً اندكي روي اين قارچ انجام شده، اين مطالعه با هدف تعيين مولكولي ژن توليد كننده پروتئين هاي شوک حرارتي ۶۰ كيلودالتوني در اين قارچ انجام شد.

مواد و روش ها

- *جدا سازي **DNA**:*

پس از جداسازي وكشت قارچ مورد نظر، با استفاده از روش تغيير يافته Choi و همكاران، DNA با وزن مولكولي بالا از قارچ درماتوفيت ميكروسپوروم كانيس جدا شد. براي اين منظور، توده ميسليومي فريز شده از اين قارچ در داخل هاون چيني و با استفاده از نيتروژن مايع خرد شد تا به شكل يک پودر يكنواخت در آمد. محلول استخراج DNA شامل Tris-HCl ۵۰ ميلي مولار (PH : ۸)، EDTA ۵۰ ميلي مولار، SDS ۳% ، β - مركاپتواتانول ۱% و پروتئيناز K (۲۰ mg/ml) مي باشد. سوسپانسيون حاصل در حرارت ^{oC} ۶۵ براي مدت يک ساعت انكوبه شد و بعد از سانتريفيوژ با دور g ×۲۵۰۰ براي مدت ۱۵ دقيقه، رسوبات سلولي حذف شد. بعد از افزودن ۲۵ ميكروليتر از محلول RNase-H (۱۰mg/ml) جهت از بين بردن RNA موجود، سوسپانسيون حاصل در دماي ۳۷ درجه براي مدت ۳۰ دقيقه انكوبه شد و عمل استخراج، ابتدا با فنل- كلروفرم - ايزوآميل الكل (۱: ۲۴: ۲۵) و سپس كلروفرم - ايزوآميل الكل (۱: ۲۴) انجام شد. در ادامه، DNA با افزودن هم حجم از ايزوپروپانول و سانتريفيوژ g × ۱۵۰۰۰ به مدت نيم ساعت رسوب داده شد كه رسوب حاصله با اتانول ۷۰% شستشو داده شد و در آب مقطر استريل نگهداري شد.

- *انجام **PCR** :*

براي طراحي پرايمر از توالي هاي مشابه موجود در بانک اطلاعات ژني مركز ملي اطلاعات بيوتكنولوژي از قارچ هاي مشابه مانند ترايكوفايتون منتاگروفايتيس و نوروسپورا كراسا استفاده شد. به وسيله نرم افزار Gene Runner پرايمرها طراحي شدند و بعد از حصول اطمينان از مناسب بودن پرايمرهاي طراحي شده به شركت MWG-Biotech آلمان سفارش داده شد.

به طـور خلاصـه، جهـت تكثيـر بخـش اول ژن، يک سوسپانسيون ۵۰ ميكروليتري به ترتيب زير تهيه گرديد:
۱۰ ميكروليـتر 10X PCR Buffer، ۱ ميـكروليـتر dNTPmix، ۲ ميكروليتر $MgCl_2$ ، ۱ ميكروليتر DNA با غلظت 40ng/µl ، ۲/۵ ميـكرو ليتر از هر يک از پرايمـرها

(۵ میکرولیتر) با غلظت 10ng/µl (10pmol) و ۱/۵ میکرولیتر آنزیم Taq که مجموعاً در ۲۹/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل حل مي شوند.

برنامه PCR قطعه ي اول ژن (ميانی) به شرح زير انجام گرديد: ^{oC} ۹۴ به مدت ۵ دقيقه (يک دور)، ^{oC} ۹۴ به مدت ۱ دقيقه، ^{oC} ۵۰ به مدت ۱ دقيقه و ^{oC}۷۲ به مدت ۱ دقيقه و سي ثانيه (۳۵ دور)، ^{oC} ۷۲ به مدت ۷ دقيقه (يک دور) و ^{oC} ۲۰ به مدت ۱ دقيقه (يک دور).

هم چنين براي تکثير بخش دوم ژن (ابتدايي)، سوسپانسيون ۵۰ ميکروليتري ديگري به قرار زير تهيه شد: ۱۰ ميکروليتر بافر 10X PCR Buffer، ۱ ميکروليتر dNTPmix، ۲ ميکروليتر $MgCl_2$، ۲ ميکروليتر DNA با غلظت 40ng/µl ، ۲/۵ ميکروليتر از هر کدام از پرايمرها (۵ ميکروليتر) با غلظت 10ng/µl (10pmol) و ۱ ميکروليتر آنزيم Taq که مجموعاً در ۲۹ ميکروليتر آب ديونيزه استريل حل مي شوند.

برنامه PCR قطعه دوم ژن به صورت زير انجام شد: ^{oC} ۹۴ به مدت ۵ دقيقه (يک دور)، ^{oC} ۹۴ به مدت ۳۰ ثانيه، ^{oC} ۵۴ به مدت ۳۰ ثانيه و ^{oC}۷۲ به مدت ۱ دقيقه (۳۵ دور) ، ^{oC} ۷۲ به مدت ۵ دقيقه (يک دور) و ^{oC} ۲۰ به مدت ۱ دقيقه (يک دور).

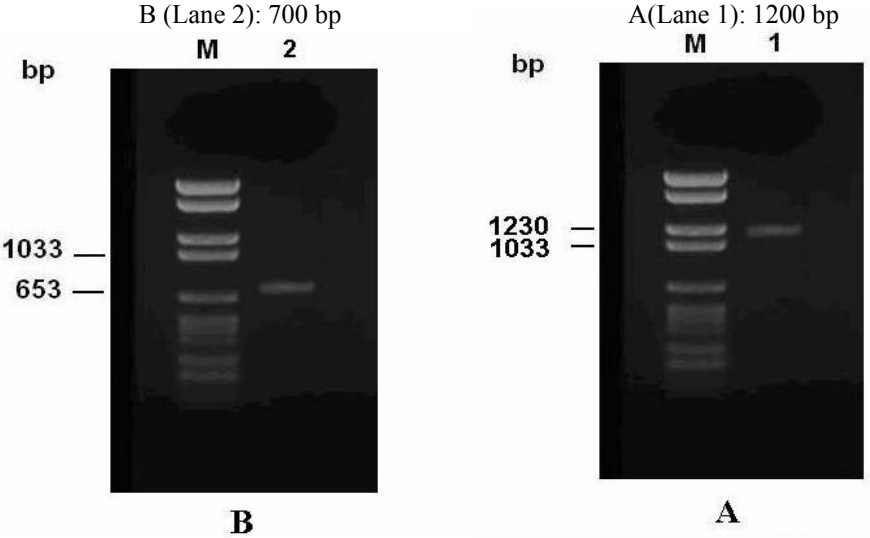
محصولات PCR در نهايت با کمک الکتروفورز با ژل آگاروز ۱% بررسي گرديدند.

- *توالي يابي قطعات* ***PCR***:

قطعات PCR ابتدا از ژل الکتروفورز جدا و سپس با کمک کيت Qiagen خالص سازي گرديدند. با استفاده از DNA دو رشته اي و پرايمرهاي طراحي شده، توالي يابي قطعات PCR با کمک کيت Dye Terminator Cycle (شرکت MWG آلمان) انجام شد. توالي نوکلئوتيدي حاصله با توالي ژن هاي مشابه در (NCBI - NIH) مقايسه گرديدند.

يافته ها

PCR هر دو بخش ژن با کمک پرايمرهاي طراحي شده انجام گرديدند و قطعات ابتدائي (B) و مياني (A) ژن McHSP60 (تصوير ۱) در کنار سايز مارکر شماره VI کمپاني Roche بر روي ژل الکتروفورز مورد تأييد قرار گرفتند.



تصوير ۱ - محصول PCR الکتروفورز شده از قطعه مياني (A) و قطعه ابتدائي (B) ژن VI: HSP 60 (Roch, Germany)
وزن مولکولي سايز مارکر شماره M

```
  1  K   G   R   N   V   L   I   E   S   S   Y   G   S   P   K   I   T   K          18
  1 aag gga agg aat gtt ttg att gag tct tca tac ggc tcc cca aaa att act aaa g        55

 56  gtatgccgtcaatttgcgcgatactctcacttaccgcggatagctaactccaaatatag                    114

 19  D   G   V   T   V   A   K   A   I   S   L   Q   D   K   F   E   N   L   G   A   38
115   ac ggt gtc acg gtt gcc aaa gct atc tca ttg caa gac aaa ttc gag aat ctc ggc gcc  173

 39  R   L   L   Q   D   V   A   S   K   T   N   E   V   A   G   D   G   T   T   T   58
174 cgt ctt ctc caa gac gtt gct tcc aag aca aac gag gtc gcc ggt gac ggt acc aca acg  233

 59  A   T   V   L   A   R   A   I   F   S   E   T   V   K   N   V   A   A   G   C   78
234 gcg acc gtg ctt gca cgt gct atc ttt tcc gag acc gtc aag aat gtt gct gct ggc tgc  293

 79  N   P   M   D   L   R   R   G   I   Q   A   A   V   D   S   V   V   E   Y   L   98
294 aac cca atg gac ttg aga aga ggc att cag gcc gcc gtt gac tcc gtc gtc gaa tat ctt  353

 99  Q   A   N   K   R   E   I   T   T   S   E   E   I   A   Q   V   A   T   I   S  118
354 caa gca aat aag aga gag atc acc acc agc gaa gag att gcg cag gtg gct acg atc tct  413

119  A   N   G   D   T   H   I   G   K   L   I   S   N   A   M   E   R   V   G   K  138
414 gct aac ggg gac acc cat atc gga aag ttg atc tcc aac gca atg gaa aga gtt gga aag  473

139  E   G   V   I   T   V   K   D   G   K   T   I   E   D   E   L   E   V   T   E  158
474 gaa ggt gtg att acg gtt aag gac gga aag acc att gaa gac gag ctt gag gtt acc gag  533

159  G   M   R   F   D   R   G   Y   V   S   P   Y   F   I   T   D   P   K   T   Q  178
534 ggc atg cga ttt gac cgc ggc tat gtt tcc cct tac ttt atc acc gac ccc aaa act cag  593

179  K   V   E   F   E   K   P   L   I   L   L   S   E   K   K   I   S   A   V   Q  198
594 aag gtt gag ttt gaa aag cct ctt att ctc ctc tct gag aag aag atc tct gcc gtc cag  563

199  D   I   I   P   A   L   E   A   S   T   T   L   R   R   P   L   V   I   I   A  218
654 gat att atc ccc gcc ctt gag gcc tct acc acc ctc cgc cga cca cta gtt atc att gct  713

219  E   D   I   E   G   E   A   L   A   V   C   I   L   N   K   L   R   G   Q   L  238
714 gag gat att gag ggc gag gct ctc gca gtc tgc att ctc aat aaa ctg cgt ggc caa ctt  773

239  Q   V   A   A   V   K   A   P   G   F   G   D   N   R   K   S   I   L   G   D  258
774 caa gtc gct gcc gtc aag gct cct ggc ttc ggt gat aac cgc aag agc atc ctt ggt gac  833

259  I   A   V   L   T   N   G   T   V   F   T   D   E   L   D   M   K   L   D   K  278
834 att gcc gtc ttg acc aat ggt acc gtg ttc aca gat gag ctt gat atg aag ctt gac aag  893

279  A   T   P   D   M   L   G   S   T   G   S   I   T   I   T   K   E   D   T   I  298
894 gct acc cca gat atg ctc ggc tcc acg ggc tcc atc acc atc acc aag gag gac act att  953

299  I   L   N   G   E   G   S   K   D   A   I   A   Q   R   C   E   Q   I   S   G  318
954 atc ctg aac ggt gag ggc tcc aag gat gcc att gct cag agg tgc gag caa att agc ggc 1013

319  I   I   A   D   P   A   T   S   E   Y   E   K   E   K   L   Q   E   R   L   A  338
1014 atc att gct gat cct gcc acc tcc gaa tac gag aag gag aag ctt cag gag cgt cta gct 1073

339  K   L   S   G   G   V   A   V   I   K   V   G   G   A   S   E   V   E   V   G  358
1074 aaa ctc tct ggt ggt gtt gct gtc atc aag gtc ggc ggt gct tct gaa gtt gaa gtt gga 1133

359  E   K   K   D   R   V   V   D   A   L   N   A   T   R   A   A   V   E   E   G  378
1134 gag aag aag gac cgt gtt gtt gat gcc ctg aac gct acc cgc gct gct gtt gag gag ggt 1193

379  I   L   P   G   G   G   T   A   L   L   K   A   S   A   N   G   L   K   D   V  398
1194 att ctc ccc ggc ggt ggt acc gcc ttg ctc aag gct tcc gcc aat ggt ttg aaa gac gtc 1253

399  K   P   A   N   F   D   Q   Q   L   G   V   S   I   V   K   N   A   I   Q   R  418
1254 aag cca gcc aac ttt gac cag cag ctg ggt gtc agc att gtt aag aac gcc atc cag aga 1313

419  P   A   R   T   I   V   E   N   A   G   L   E   G   S   V   I   V   G   K   L  438
1314 cct gct cgt act att gtt gag aat gct ggg ttg gag ggt agc gtc att gtg ggc aag ctt 1373

439  T   D   E   F   A   D   D   F   N   R   G   F   D   S   A   K   G   E   Y   V  458
1374 aca gat gaa ttt gcg gac gat ttc aat aga ggc ttc gat agc gcc aag gga gag tac gtt 1433

459  D   M   I   Q   A   G   I   V   D   P   L   K   V   V   R   T   A   L   V   D  478
1434 gat atg atc cag gct gga att gtc gac cca ttg aag gtt gtt cgc acc gct ctc gtc gat 1493

479  A   S   G   V   A   S   L   L   G   T   T   E   V   A   I   V   E   A   P      497
1494 gcc agt ggt gtt gca tcc cta ctc ggt acc acc gag gtt gca atc gtt gaa gct ccc     1550
```

تصوير ۲- توالي نوكلئوتيدي و پروتئيني ژن HSP 60 در ميكروسپوروم كانيس

تـوالي نوکلئـوتيـدي و پـروتئيـني ژن McHSP60 به دست آمده، در تصوير ۲ مشخص است. اين توالي شامل ۱۵۵۰ نوکلئوتيد است که پروتئيني با ۴۹۷ آمينواسيد را رمز مي نمـايد. مقايـسه توالي نوکلئـوتيـدي ژن مـورد نظـر در Genbank آمريـکا همـولـوژي معـني داري را بـا سـاير HSP هاي يـوکاريـوتي۶۰ کيلودالتوني نشان مي دهد. توالي آمينواسيدي پروتئين ساخته شده، بيش از ۹۷% با Coccidioides immitis و بيش از ۹۲% با Aspergillus fumigatus همولوژي نشان مي دهد تجزيه و تحليل پروتئين حاصله که از اين به بعد به صورت McHSP60 معـرفي مي شـود بيانگر غنـي بودن آن از گلايسين، آلانين و گلوتاميک اسيد بوده و در مقابل مقدار تريپتوفان و سيستئين آن ناچيز است.

ژن سکانس شده از قارچ ميکروسپوروم کنيس به عنوان يک HSP 60، به بانک اطلاعات ژني مرکز ملي اطلاعات بيـوتکنـولوژي (NCBI) در آمريـکا ارائـه و با شمـاره DQ981834 ثبت گرديد.

بحث

به طـور کلي، درماتوفيـت ها داراي ۳ جنـس مهـم Trichophyton، Microsporum و Epidermophyton مي باشنـد که تاکنـون تحقيـقات مولکـولي روي جنـس اپيدرموفايتون کم تر از دو جنس ديگر انجام شده است. قارچ مورد مطالعه يعني M.canis از عوامل حيوان دوست بوده که در انسان نيز کچلي ايجاد مي کند اما کچلي کشاله ران و دست و پا را به ندرت ايجاد مي کند (۱۱).

شـناسائي گونه هاي ميکروسپوروم را از طريق PCR و PCR-RFLP با کمک ژن DNA- توپوايزومراز II انجام داده اند (۱۲). البته نوع خاصي از PCR به نام ISSR-PCR (Inter-single-sequence-repeat-PCR) در تشخيص M.canis مورد استفاده قرار گرفته است (۱۳). در مطالعه اي جديد، ژن تنظيم کننده مصرف نيتروژن در اين قارچ مورد مطالعه دقيق قرار گرفته است و رشد موتان ها فاقد اين ژن در محيط هاي مختلف نيتروژن دار بررسي گرديده اند (۱۴).

پروتئين هاي شوک حرارتي يا HSP ها، کاپرون هاي مولکولي بوده و از طريق کنترل تا خوردگي پروتئين هاي تازه توليد شده، در انتقال آن ها به درون اندامک هاي سلولي نيز دخالت دارند ضمن اين که سلول زنده را در مقابل تنش هاي محيـطـي نـظير تابـش فرا بنـفش ، املاح فلـزات سنگين و شوک هاي گرمائي مقاوم مي سازند (۳-۱ و ۵). به نظر مي رسـد که HSP، ۶۰ کيـلودالتـوني در تجـمع پروتئين ها نيز دخالت داشته باشد (۱۵). با استفاده از جهش يافتگان فاقد HSP60، مشخص شده که فقدان اين پروتئين باعث تغيير در مرفولوژي DNA ميتوکندري مي شود (۱۶). HSP60 مي تواند به عنوان ادهسين اختصاصي ماکروفاژها نيز عمل کند (۱۷). يک ژن رمز کننده HSP60 از قارچ Paracoccidioides brasiliensis به دسـت آمـده که حاوي ۲ اينترون است و پروتئيني را با ۵۹۲ آمينو اسيد کد مي کند (۱۸).

Roska و همـکـاران، ژن سـنـتـز کـنـنـده HSP60 را در قـارچ T.mentagrophytes مـورد مطالعه قرار داده اند. (NCBI , NIH : AF199024).

در مطالعه اخير، براي بررسي ژن McHSP60 که داراي توالي اگزوني و اينتروني است از پرايمرهاي اليگونوکلئوتيدي استفاده شده که بخشي از اين ژن را که مشتمل بر اگزون و اينترون مي باشد تکثير نموده است. اين ژن در حال حاضر داراي ۱۵۵۰ نوکلئـوتيـد است کـه پروتئيـني را با ۴۹۷ آمينواسيد رمز مي نمايد. از نظر توالي نوکلئوتيدي، اين ژن شباهت بسيار زيادي با ژن هاي HSP60 يوکاريوت هاي ديگر داشتـه به طـوري که بيـش از ۹۷% با Coccidioides immitis و بيـش از ۸۲% بـا Aspergillus nidulans همولوژي نشان مي دهد.

HSP ها تاکنـون در موجودات مختلفي هم چون قارچ ها،

انسان، مگس سركه و كرم ها مورد مطالعه قرار گرفته اند. اين پروتئين ها در ايجاد پاسخ هاي ايمني مختلف، چه ضد ميكروبي و چه خود ايمني در ميزبان مؤثر هستند و انواعي از آن ها كه فعاليت آنتي ژنيـک دارند، به عنـوان اهـدافي براي پاسـخ هاي ايمني سلولي و هومورال محسـوب مي شـوند (۲۳-۱۹).

REFERENCES

1. Trautinger F. 72-kDa heat shock protein is a mediator resistance to ultraviolet B light. J invests Dermatol 1995; 105: 160-2.
2. Linqusit S, Craig EA. The heat shock proteins. Ann Rev Genet 1988; 22: 631-7.
3. Leppa S. Heat shock response – pathophysiological implication. Ann Med 1997; 29: 73-8.
4. Steen BR, Lian T, Zuyderduyn S, MacDonald WK, Marra M, Jones SJ, et al. Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Genome Res 2002; 12(9):1386-400.
5. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature 1996; 381: 571-80.
6. Ohtsuka K, Kawashima D, Gu Y, Saito K. Inducers and co-inducers of molecular chaperones. Int J Hyperthermia 2005; 21(8):703-11.
7. Hemmingsen SM. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. Nature 1988; 333: 330-4.
8. Chirico WJ. 70-kDa heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. Nature 1988; 332: 805-10.
9. Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA, Schekman R. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. Nature 1988; 332: 800-05.
10. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophyte. Clin Microbial Rev 1995; 8: 240-59.
11. Rippon J. Medical Mycology. 3rd ed. WB Saunders. 1988; P: 336-57.
12. Kanbe T, Suzuki Y, Kamiya A, Mochizuki T, Kawasaki M, Fujihiro M, et al. Species identification of dermatophytes *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes. J Dermatol Sci 2003; 33(1):41-54.
13. Cano J, Rezusta A, Solé M, Gil J, Rubio MC, Revillo MJ, et al. Inter-single-sequence-repeat-PCR typing as a new tool for identification of *Microsporum canis* strains. J Dermatol Sci 2005; 39(1):17-21.
14. Yamada T. Isolation, characterization and disruption of dnr1, the areA/int-2-like nitrogen regulatory gene of the zoophilic dermatophyte. Med Mycol 2006; 44(3):243-52.
15. Cheng MY, Hartl FU, Horwich AL. The mitochondrial chaperonin HSP60 is required for its own assembly. Nature 1990; 348: 455-8.

16. Kaufman BA, Kolesar JE, Perlman PS, Butow RA. A function for the mitochondrial chaperonin HSP60 in the structure and transmission of mitochondrial DNA nucleoids in Saccharomyces cerevisiae. J Cell Biol 2003; 163(3): 457-61.

17. Woods JP. Konocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. Curr Opin Microbiol 2003; 6 (4): 327-31.

18. Izacc SM, Gomez FJ, Jesuino RS, Fonseca CA, Felipe MS, Deepe GS, et al. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol 2001; 39(5):445-55.

19. Bahr GM, Rook GA, al-Saffar M, Van Embden J, Stanford JL, Behbehani K. Antibody levels to mycobacteria in relation to HLA type: evidence for non-HLA-linked high levels of antibody to the 65-kDa heat shock Protein of *M. bovis* in rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol 1998; 74: 211-15.

20. Tsoulfa G. Raised serum IgG and IgA antibodies to mycobacterial antigens in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1989; 48: 118-23.

21. Gomes FJ. An 80 kDa antigen from *Histoplasma capsulatum* that has homology with HSP70 induces cell-mediated immune response in mice. Infect Immune 1992; 60: 2565-71.

22. Milan R, Alois R, Josef C, Jana B, Evzen W. Recombinant protein and DNA vaccines derived from hsp60 *Trichophyton mentagrophtosis* control the clinical course of trichophytosis in bovine species and guinea - pigs. Mycoses 2004; 47(9,10): 407-17.

23. Mizzen L: Immune response to stress proteins (application to infectious disease and cancer). Biotherapy 1998; 10: 173-89.