

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Saša KASTELIC

**IDENTIFIKACIJA PROTEINOV SKLEPNEGA
HRUSTANCA KOKOŠI, KI REAGIRAJO Z
AVTOPROTITELESI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Saša KASTELIC

**IDENTIFIKACIJA PROTEINOV SKLEPNEGA HRUSTANCA
KOKOŠI, KI REAGIRAJO Z AVTOPROTITELESI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IDENTIFICATION OF CHICKEN ARTICULAR CARTILAGE
PROTEINS THAT REACT WITH AUTOANTIBODIES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Mojco Narat in za somentorico dr. Ireno Oven.

Recenzentka: prof. dr. Vladka Čurin Šerbec.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- Članica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Članica: dr. Irena OVEN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Članica: prof. dr. Vladka ČURIN ŠERBEC
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Zavod za transfuzijsko medicino

Datum zagovora: 09. september 2011

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Saša KASTELIC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579:636.5(043.2)=163.6
- KG mikrobiologija/mikoplazme/*Mycoplasma synoviae*/imunologija živali/perutnina/
kokoši/kužni sinovitis/hrustanec/hondrociti/sinovialna tekočina/serum/proteini
/avtoprotitelesa
- KK AGRIS L73/6100
- AV KASTELIC, Saša
- SA NARAT, Mojca (mentorica)/OVEN, Irena (somentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
- LI 2011
- IN IDENTIFIKACIJA PROTEINOV SKLEPNEGA HRUSTANCA KOKOŠI, KI
REAGIRAJO Z AVTOPROTITELESI
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 47 str., 6 pregl., 8 sl., 36 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Patogena bakterija *Mycoplasma synoviae* lahko pri kokoših in puranih v določenih pogojih povzroča kužni sinovitis. Značilni znaki obolenja so vnetje sklepov, sklepnih ovojníc in ovojnic kit ter poškodbe okoliškega tkiva, kar vodi do propada hrustančnega tkiva. Bolezen spremljajo avtoimunski procesi, ki spominjajo na tiste pri revmatoidnem artritisu. V nalogi smo želeli ugotoviti ali so v sinovialnih tekočinah in serumih kokoši, ki so bile naravno ali eksperimentalno okužene z *Mycoplasma synoviae*, prisotna avtoprotitelesa, ki se vežejo na proteine hrustančnega tkiva, hondrocitov in na kokošji kolagen tipa II. Z SDS-PAGE elektroforezo in analizo western smo ločili proteine hrustančnega tkiva, hondrocitov in kolagena in jih inkubirali v kunčjih protitelesih proti kokošjim IgG. Ugotovili smo, da so v sinovialnih tekočinah in serumih prisotna avtoprotitelesa, ki so se vezala na proteine velikosti od 15 do 75 kDa. Velikost nekaterih proteinov je sovpadala z velikostjo proteinov, ki se v literaturi pojavljajo kot kandidatni avtoantigeni pri artritisu.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579:636.5(043.2)=163.6
- CX microbiology/mycoplasmas/*Mycoplasma synoviae*/animal immunology/poultry/hens/infectious synovitis/cartilage/chondrocytes/synovial fluid/serum/proteins/autoantibodies
- CC AGRIS L73/6100
- AU KASTELIC, Saša
- AA NARAT, Mojca (supervisor)/OVEN, Irena (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2011
- TI IDENTIFICATION OF CHICKEN ARTICULAR CARTILAGE PROTEINS THAT REACT WITH AUTOANTIBODIES
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO IX, 47 p., 6 tab., 8 fig., 36 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB *Mycoplasma synoviae*, pathogen of chicken and turkeys, causes under certain conditions a disease called infectious synovitis. The disease is characterized as inflammation of joints, synovial lining and tendon sheaths as well as progressive damage to the surrounding tissue, which can lead to the destruction of cartilage tissue. Infectious synovitis is believed to have an autoimmune nature, which is similar to that of rheumatoid arthritis. In this study we wanted to determine whether the synovial fluids and sera of naturally or experimentally infected chickens contain autoantibodies, that can bind to the proteins of cartilage tissue, chondrocytes or to chicken collagene type II. We used SDS-PAGE electrophoresis and western blot analysis to gain a protein profile of cartilage tissue, chondrocytes and collagene and then incubated these samples in rabbit anti chicken IgG antibodies. We determined, that there are autoantibodies present in synovial fluids and sera and that these autoantibodies bind with proteins between 15 and 75 kDa in size. We then compared the size of our identified proteins with know candidate autoantigens of arthritis from scientific literature and found that some of them coincide.

KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija (KDI).....	III
	Key Words Documentation (KWD).....	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic.....	VII
	Kazalo slik.....	VIII
	Okrajšave in simboli.....	IX
1	UVOD	1
1.1	OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2	NAMEN NALOGE	1
1.3	DELOVNE HIPOTEZE	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	ROD <i>MYCOPLASMA</i>	3
2.1.1	Klasifikacija in značilnosti	3
2.1.2	Aviarne mikoplazme	4
2.1.3	<i>Mycoplasma synoviae</i>	6
2.2	AVTOIMUNOST	7
2.2.1	Vloga okužb pri nastanku avtoimunosti	8
2.2.2	Kužni sinovitis in avtoimunost	9
2.3	HRUSTANČNO TKIVO IN HONDROCITI	10
2.3.1	Vrste hrustanca	11
2.3.2	Zgradba pravega sklepa	12
2.3.3	Zgradba in funkcija hondrocitov	12
2.3.4	Izvenselični matriks sklepnega hrustanca	13
2.3.4.1	Kolageni	13
2.3.4.2	Proteoglikani	13
2.3.4.3	Voda	14
3	MATERIALI IN METODE	15
3.1	PRIPRAVA MATERIALA	15

3.1.1	Hondrociti	15
3.1.2	Hrustančno tkivo	17
3.1.3	Kolagen	18
3.1.4	Kokošje sinovialne tekočine	18
3.1.5	Kokošji serumi	19
3.2	ANALIZA WESTERN	19
3.2.1	SDS-PAGE elektroforeza	19
3.2.2	Prenos proteinov na membrano	21
3.2.3	Imunodetekcija	23
3.2.3.1	Test DIBA	23
3.2.3.2	Reakcije proteinov s kokošnjimi protitelesi	24
3.3	OBDELAVA REZULTATOV	25
4	REZULTATI	26
4.1	REAKCIJE PROTEINOV IZ HRUSTANČNEGA TKIVA Z AVTOPROTITELESI	26
4.2	REAKCIJE PROTEINOV KOKOŠJIH HONDROCITOV S KOKOŠJIMI IgG PROTITELESI	29
4.3	PROTITELESA PROTI KOKOŠJEMU KOLAGENU	31
4.4	PROTEINI, KI REAGIRAJO Z AVTOPROTITELESI	33
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	36
5.1	RAZPRAVA	36
5.2	SKLEPI	39
6	POVZETEK	41
7	VIRI	43
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pregled vrst aviarnih mikoplazem in njihovih gostiteljev (prirejeno po Bradbury, 1998).....	5
Preglednica 2: Sestava gojišča za gojenje celične kulture kokošjih hondrocitov.	15
Preglednica 3: Razmerja sestavin v ločevalnem in nanašalnem gelu.....	20
Preglednica 4: Pregled uporabljenih vzorcev in njihovih oznak: serumi in sinovialne tekočine okuženih in neokuženih živali ter hrustančna tkiva, hondrociti in kolagen.	24
Preglednica 5: Prikaz proteinov po ocenjenih molekulskih masah, ki so reagirali z (avto) protitelesi v serumu št. 4 ter sinovialnih tekočinah MS-1 in MS-3 iz okuženih kokoši.	33
Preglednica 6: Pregled najbolj pogostih proteinov, ki se pojavljajo kot glavni kandidatni avtoantigeni pri artritisu.	35

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz predlaganih mehanizmov avtoimunosti (prirejeno po Abbas in Lichtman, 2001:165).....	8
Slika 2: Prikaz zdravega stopala kokoši (McLelland, 1990: 14) in stopala kokoši, ki je okužena z <i>Mycoplasma synoviae</i> in pri kateri se je razvil kužni sinovitis (Lockaby in sod., 1998: 182).	10
Slika 3: Primarna kultura kokošjih hrustančnih celic, gojenih <i>in vitro</i> , kot videna pod invertnim mikroskopom na 100-kratni povečavi.	12
Slika 4: Prikaz poteka SDS-PAGE elektroforeze.	21
Slika 5: Prikaz razporeditve filter papirjev, membrane in gela glede na naboj plošče za prenos proteinov iz gela na membrano.	22
Slika 6: Reakcije proteinov iz razgrajenih hrustančnih tkiv T1 (slika A), T12 (slika B) in T13 (slika C) s protitelesi, ki so prisotna v serumih ali sinovialnih tekočinah kokoši, ki so bile naravno ali eksperimentalno okužene z <i>Mycoplasma synoviae</i> . Serumi in sinovialne tekočine neokuženih kokoši so uporabljeni kot primerjalna kontrola. Na drugi stopnji testa so bila uporabljena kunčja protitelesa proti kokošjim IgG, konjugirana s peroksidazo in nato dodan substrat TrueBlue.....	27
Slika 7: Reakcije proteinov iz razgrajenih kokošjih hondrocitov s protitelesi, ki so prisotna v serumih ali sinovialnih tekočinah kokoši, ki so bile naravno ali eksperimentalno okužene z <i>Mycoplasma synoviae</i> . Serumi in sinovialne tekočine neokuženih kokoši so uporabljeni kot primerjalna kontrola. Na drugi stopnji testa so bila uporabljena kunčja protitelesa proti kokošjim IgG, konjugirana s peroksidazo in nato dodan substrat TrueBlue.	30
Slika 8: Reakcije nerazgrajenega in encimsko razgrajenega kolagena s protitelesi piščančjega seruma št. 4 in sinovialnih tekočin MS-1 in MS-3, ki izvirajo iz z <i>Mycoplasma synoviae</i> okuženih piščancev. Na drugi stopnji testa so bila uporabljena kunčja protitelesa proti kokošjim IgG, konjugirana s peroksidazo in nato dodan substrat TrueBlue.....	32

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APC	antigen predstavitvena celica (<u>a</u> ntigen <u>p</u> resenting <u>c</u> ell)
APS	iniciator polimerizacije, amonijev persulfat (<u>a</u> mmonium <u>p</u> ersulfate)
CAPS	pufer (3-(<u>c</u> yclohexyl <u>a</u> mino)-1-propanesulfonic acid)
CCH	kokošje hrustančne celice (<u>c</u> hicken <u>c</u> hondrocyte cells)
DIBA	encimsko-immunski test (<u>d</u> ot <u>i</u> mmunob <u>i</u> nding <u>a</u> ssay)
D-MEM	modificirano gojišče za celične kulture (<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium)
DMSO	kriprotektant, dimetil sulfoksid (<u>d</u> imethyl <u>s</u> ulfo <u>x</u> ide)
DTT	reducent, ditiotretitol (<u>d</u> ithio <u>t</u> hreit <u>o</u> l)
EBP	pufer za prenos proteinov iz gela na membrano (<u>e</u> lektro <u>b</u> loting pufer)
EDTA	kelator (<u>e</u> tilend <u>a</u> minotetrao <u>e</u> tna kislina)
FBS	fetalni goveji serum (<u>f</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum)
GC	gvanin- <u>c</u> itozin, DNA nukleotida
HBSS	pufer (<u>H</u> ank's <u>b</u> alanced <u>s</u> alt <u>s</u> olution)
kbp	kilo-bazni pari, enota za opis dolžine nukleinskih kislin (1000 baznih parov)
kDa	kilodalton, enota za molekulsko maso proteinov
M, mM	mol, milimol, enoti za koncentracijo
NAD	koencim v celičnem metabolizmu, <u>n</u> ikotinamid <u>a</u> denin <u>d</u> inukleotid
PBS	fosfatni pufer (<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PVDF	polivinildifluorid (<u>p</u> oly <u>v</u> inylidene <u>f</u> luoride)
rpm	obrati na minuto (<u>r</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute)
SDS	natrijev dodecil sulfat (<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
SDS-PAGE	elektroforeza v poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom
TEMED	ligand kovinskih ionov (N, N, N', N'-tetramethylethylene-diamine)
TRIS	pufer, 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Mikoplazme so bakterije, ki spadajo v razred *Mollicutes*. Ta vključuje najmanjše prokariote, ki so še sposobni samostojnega podvojevanja. Njihove skupne značilnosti so majhen genom in posledično kompleksne prehranske zahteve, odsotnost celične stene, veliko število membranskih lipoproteinov, ki delujejo kot antigeni, in prilagojenost na parazitski način življenja (Razin in sod., 1998).

Mycoplasma synoviae je patogena mikoplazma, ki povzroča bolezni pri kokoših in puranih. Tipična okužba zgornjega dihalnega trakta lahko s prenosom bakterije do sklepov (krvni obtok) napreduje do kužnega sinovitisisa (akutno ali kronično vnetje sklepov in sklepnih ovojnica). Že dolgo je znano, da kužni sinovitis spremljajo tudi bolezenski procesi, ki po svoji naravi spominjajo na tiste pri avtoimunskih boleznih (Kerr in Olson, 1970; Jordan, 1985). Ni znano, ali so v sinovialni tekočini iz vnetih kokošjih sklepov prisotna avtoprotitelesa. Prav tako niso poznani kandidatni avtoantigeni, ki bi sprožili avtoimunski odziv.

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti, ali so v sinovialnih tekočinah in serumih kokoši z kužnim sinovitisom (naravna in eksperimentalna okužba z *M. synoviae*) prisotna avtoprotitelesa proti hrustančnemu tkivu, hondrocitom in kolagenu tipa II. Kot primerjalno kontrolo smo uporabili serume in sinovialne tekočine kokoši, ki niso bile okužene z *M. synoviae*.

1.2 NAMEN NALOGE

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, ali so v serumih in sinovialnih tekočinah kokoši, ki so bile naravno ali eksperimentalno okužene z mikroorganizmom *Mycoplasma synoviae*, prisotna avtoprotitelesa, ki prepoznavajo in se vežejo na proteine kokošjega hrustančnega

tkiva, hondrocitov ali na razgrajeni kolagen. Zanimalo nas je tudi, koliko je v omenjenih vzorcih različnih proteinov, ki reagirajo z avtoprotitelesi, ter kakšni so vzorci ponavljanja prisotnosti teh proteinov (avtoantigenov).

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakovali smo, da bomo z analizo western dokazali, da so v serumih in sinovialnih tekočinah kokoši, okuženih z *M. synoviae*, prisotna avtoprotitelesa, ki prepoznavajo proteine kokošnjega sklepnega tkiva. Hkrati smo pričakovali, da v serumih in sinovialnih tekočinah neokuženih kokoši ne bomo zaznali reakcij na lastne proteine.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ROD *MYCOPLASMA*

2.1.1 Klasifikacija in značilnosti

Mikoplazme so bakterije, ki jih uvrščamo v deblo *Firmicutes*, razred *Mollicutes* in red *Mycoplasmatales* (Razin in Herrmann, 2002; Kleven, 2003). Razred *Mollicutes* se je razvil iz po Gramu pozitivnih bakterij v procesu degenerativne evolucije, ki se v tem primeru nanaša na zmanjševanje velikosti genoma (Razin in sod., 1998). Pripadniki rodu *Mycoplasma* so večinoma komenzali ali paraziti rastlin, živali in človeka (Lockaby in Hoerr, 1999). Razred *Mollicutes* vključuje najmanjše prokariote, ki so še sposobni samostojnega podvojevanja in imajo zelo majhno število genov. Zanimanje za mikoplazme med raziskovalci vztrajno narašča, predvsem v smislu definiranja minimalnega seta genov, ki so nujno potrebni za vzdrževanje življenja. Opisanih je več kot 100 vrst rodu *Mycoplasma*, število novih vrst pa še vedno narašča (Razin in Herrmann, 2002).

Glavna značilnost razreda *Mollicutes* je popolna odsotnost celične stene (od tod tudi ime, lat. *mollis* – mehek, *cutis* – koža). Mikoplazme od okolja loči le plazemska membrana, sestavljena iz proteinov, lipidov in lipoproteinov (slednji so močni antigeni v imunskih reakcijah s protitelesi gostitelja) (Razin in sod., 1998). Odsotnost celične stene vpliva na morfologijo celic in omogoča odpornost proti antibiotikom, ki vplivajo na sintezo celične stene (npr. penicilini). Genom mikoplazem variira od 580 kbp (pri *M. genitalium*) do 1350 kbp (pri *M. mycoides* subsp. *mycoides*) in ima nizko vsebnost GC baznih parov (23-40 %) (Kleven, 2003; Razin in sod., 1998). Majhno število genov je povezano s parazitskim načinom življenja in vpliva na kompleksnost prehranskih zahtev. Število genov, povezanih z metabolizmom in reprodukcijo, je minimalno, večina genskih produktov sodeluje pri poteh signalne transdukcije in drugih mehanizmih, ki omogočajo uspešno kolonizacijo gostitelja in/ali izogibanje njegovemu imunskemu sistemu. Nutriente, potrebne za rast in razvoj *in vivo*, pridobivajo preko gostitelja. Za gojenje mikoplazem v *in vitro* pogojih uporabljamo kompleksne medije, bogate s proteini, maščobnimi kislinami, holesterolom in

drugimi specifičnimi hranili za rast. Ravno zaradi skromnosti obstoječih biosintetskih poti je mikoplazme tako težko gojiti v *in vitro* pogojih. Zato pristopi gojenja temeljijo na kokultivaciji mikoplazem z evkariontskimi celičnimi linijami (Razin in sod., 1998).

Mikoplazme so patogene bakterije, ki pri svojem gostitelju povzročajo akutne ali kronične okužbe. Pri živalih vplivajo predvsem na upad produkcije, redkeje pa povzročijo smrt gostitelja. Razlike med pripadniki razreda so opazne predvsem v virulenci posameznih sevov, tkivnem tropizmu (epitelna tkiva, respiratorni trakt, urogenitalni trakt, možgani, kloaka, sklepi) in načinu vstopa v gostitelja (preko valilnih jajc na embrio, respiratornega ali reproduktivnega trakta, direktni prenos z aerosolom). Posamezni sevi so navadno zelo striktno gostiteljsko in tkivno specifični. Večinoma so izvencelični paraziti, ki kolonizirajo mukozne membrane epitelnih tkiv, nekateri sevi izkazujejo zmožnost vstopanja v celice (*M. gallisepticum*, *M. penetrans*, *M. synoviae*). Da lahko vzdržujejo parazitski način življenja in kolonizirajo tkiva gostitelja, morajo mikoplazme posedovati površinske komponente, ki jim omogočajo pritrjanje na površino tkiv in celic (npr. adhezini) (Jordan, 1985; Razin in sod., 1998; Dušanić in sod., 2009). Poškodbe tkiv gostitelja so povezane z lokalnim ali sistemskim imunskim odzivom gostitelja na patogeni mikroorganizem, ki ga lahko spremljata imunosupresija in avtoimunost. Lahko je posledica porabe celičnih nutrientov s strani mikroorganizma in/ali proizvodnje škodljivih metabolitov (vodikov peroksid, dušikov oksid) v visokih koncentracijah. Nekatere mikoplazme stimulirajo naravno citotoksično aktivnost in proizvodnjo TNF, lahko stimulirajo avtoimunske odzive (meritve zvišanih vrednosti revmatoidnega faktorja, nastanek imunskih kompleksov) ali se izogibajo mehanizmom imunskega sistema gostitelja z biološko mimikrijo (Jordan, 1985; Lavrič in sod., 2007; Lockaby in sod., 1998).

2.1.2 Aviarne mikoplazme

Poznamo 23 vrst aviarnih mikoplazem, ki okužujejo domače ali divje ptice. Pregled vrst je podan v Preglednici 1.

Preglednica 1: Pregled vrst aviarnih mikoplazem in njihovih gostiteljev (prirejeno po Bradbury, 1998).

Vrsta	Gostitelj
<i>Mycoplasma anatis</i>	raca
<i>Mycoplasma anseris</i>	gos
<i>Mycoplasma buteonis</i>	kanja
<i>Mycoplasma cloacale</i>	puran, gos
<i>Mycoplasma columbinasale</i>	golob
<i>Mycoplasma columbinum</i>	golob
<i>Mycoplasma columborale</i>	golob
<i>Mycoplasma corogypsi</i>	jastreb
<i>Mycoplasma falconis</i>	sokol
<i>Mycoplasma gallinaceum</i>	kokoš
<i>Mycoplasma gallinarum</i>	kokoš, puran
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	kokoš, puran, fazan, jerebica
<i>Mycoplasma gallopavonis</i>	puran
<i>Mycoplasma glycophilum</i>	kokoš
<i>Mycoplasma gypis</i>	jastreb
<i>Mycoplasma iners</i>	kokoš, puran
<i>Mycoplasma iowae</i>	puran, kokoš
<i>Mycoplasma imitans</i>	raca, gos, jerebica
<i>Mycoplasma lipofaciens</i>	kokoš, puran
<i>Mycoplasma meleagridis</i>	puran
<i>Mycoplasma pullorum</i>	kokoš
<i>Mycoplasma struni</i>	škorec
<i>Mycoplasma synoviae</i>	kokoš, puran

Najbolj pogoste so mikoplazme, ki okužujejo perutnino (kokoši in purani), npr. *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae*, *M. meleagridis* ter občasno tudi *M. gallinarum*. Te vrste povzročajo bolezni in izgubo produkcije (jajca, meso), kar povzroča velike gospodarske izgube pri intenzivni reji perutnine v industriji. Za patogene mikoplazme perutnine je značilno, da vstopijo v gostitelja preko dihal in se od tam razširijo na tarčne organe. Na splošno so mlajše živali veliko bolj občutljive za okužbo. Faktorji, ki vplivajo na patogenost, vključujejo npr. citadhezijo na tarčne celice gostitelja, izogibanje obrambnim mehanizmom imunskega sistema gostitelja, nastanek poškodb, ki jih povzročajo produkti imunskega sistema, proizvodnjo toksinov in škodljive učinke na

celični metabolizem gostitelja. Ptičje mikoplazme praviloma povzročajo okužbe samo pri pticah in ne prehajajo na druge vrste (Berčič in sod., 2008b; Jordan, 1985; Lavrič in sod., 2008; Lockaby in Hoerr, 1999).

2.1.3 *Mycoplasma synoviae*

Mycoplasma synoviae povzroča bolezni kokoši in puranov. Povzroča subklinično okužbo dihalnega trakta, ki se lahko razširi na druge organe in napreduje v sistemske okužbe. Lahko zaide v sklepe in povzroči vnetje sklepov in sklepnih ovojnic, imenovano kužni sinovitis (Kawakubo in sod., 1980). Kot samostojna vrsta je bila priznana leta 1982 (Jordan in sod., 1982).

Podobno kot drugi predstavniki razreda *Mollicutes*, je tudi *M. synoviae* brez celične stene, ima majhen genom (900 kbp za tipski sev WVU 1853) in kompleksne prehranske zahteve. Celice so okrogle ali hruškaste oblike in v premeru merijo 300-500 nm. Za rast *in vitro* potrebuje s proteini bogat medij, preferenčno svinjski serum, z obveznim dodatkom NAD in holesterola. Fermentira glukozo in maltozo, ni pa sposobna fermentacije laktoze, dulcitolu, salicinu ali trehaloze. Optimalna rast je pri 37°C in pH okrog 7,0 (Kleven, 2003).

Patogeneza okužbe z *M. synoviae* je kompleksna in najverjetneje vključuje več faktorjev. Sevi, ki povzročajo okužbe na perutninskih farmah, imajo različno patogenost. Nekateri ne povzročajo bolezni, drugi pa povzročajo respiratorne bolezni in/ali sinovitis. Okužba z *M. synoviae* lahko povzroči obolenje zgornjih dihalnih poti (vnetje zračnih vrečk), suboptimalno produkcijo jajc in mesa, akutni ali kronični progresivni artritis (pri ptičih s sistemsko obliko bolezni tudi poliartritis, miokarditis, glomerulonefritis, splenomegalijo, anemijo in retikulocitozo). Narava teh bolezni izkazuje veliko podobnosti s človeškimi boleznimi imunskih kompleksov (revmatoidni artritis in sistemski lupus eritematosus). Zato je kužni sinovitis pri kokoših lahko uporaben eksperimentalni model za proučevanje revmatoidnega artritisa pri človeku. Prenos do sklepov naj bi potekal preko krvnega obtoka (Jordan, 1985).

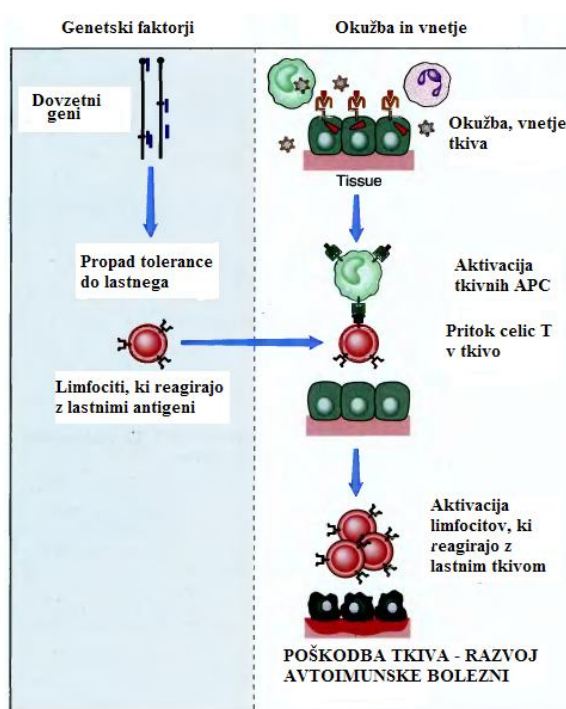
Razvoj bolezni je odvisen od številnih virulenčnih dejavnikov. Citadhezini (membransko vezani pritrditveni proteini) omogočajo pripenjanje mikoplazem na membrane celic gostitelja in zadrževanje bakterije na mestu okužbe. Citadherenca je predpogoj za preživetje bakterije v gostitelju in je tudi prvi dejavnik, ki povzroča tkivne poškodbe (Lockaby in sod., 1998; Jordan, 1985). *M. synoviae* se na kokošje celice veže tako, da se pritrdi na receptorje, ki vsebujejo sialično kislino (Aldridge, 1975). Pritrditev (med drugim tudi na eritrocite) omogoča hemaglutinin VlhA, ki je imunodominanten lipoprotein, vendar se pojavlja v številnih antigenskih različicah (Noormohammadi in sod., 2000; Benčina, 2002). Še pred približno desetletjem so bili dejavniki patogenosti *M. synoviae* slabo poznani (Lockaby in Hoerr, 1999). Novejše raziskave so razkrile nekatere nove dejavnike, ki so verjetno vključeni v patološke procese, ki jih povzroča *M. synoviae*. V pogojih *in vitro* *M. synoviae* vstopa v kokošje celice, npr. v eritrocite in hondrocite (Dušanić in sod., 2009). To lahko povzroči njihovo odmiranje in s tem poškodbe tkiv, tudi v sklepih. *M. synoviae* sintetizira nevraminidazo NanH, ki odcepi sialično kislino s kokošjih glikoproteinov, vključno z IgG (Berčič in sod., 2011). Večja sinteza NanH je povezana z večjo invazivnostjo in patogenostjo sevov *M. synoviae* (May in sod., 2007; Berčič in sod., 2008b). *M. synoviae* sintetizira tudi cisteinsko proteazo CysP, ki cepi kokošje proteine, tudi njihove IgG (Cizelj in sod., 2011).

Do patoloških procesov lahko pride tudi zaradi interakcij *M. synoviae* z imunskimi in drugimi celicami gostitelja. *M. synoviae*, zlasti njen lipoprotein MSPB (prvi del hemaglutinina VlhA) stimulira kokošje celice, npr. makrofage, kar vpliva na povečano sintezo dušikovega oksida ter interlevkinov IL-1 β in IL-6 (Lavrič in sod., 2007). IL-1 β in IL-6 pojačata stopnjo vnetja, ki je očitno tudi v prvi (akutni) fazi kužnega sinovitisa, ki ga povzroča *M. synoviae* (Narat in sod., 1998).

2.2 AVTOIMUNOST

Avtoimunska reakcija je biološki pojav, pri katerem se imunski odziv razvije kot odgovor na srečanje s telesu lastnimi (avtolognimi) antigeni. Pomembno je poudariti, da ima telo obrambne mehanizme, ki v normalnem stanju preprečujejo reakcije lastnih protiteles z

lastnimi antigeni. V primeru avtoimunosti so torej porušeni mehanizmi tolerance do lastnega. Specifični vzroki in mehanizmi, ki so vključeni v razvoj avtoimunosti so na splošno slabo raziskani (pri človeku nekoliko bolje kot pri živalih) in so zelo različni pri različnih avtoimunskih boleznih. Dva glavna razloga, ki vplivata na razvoj avtoimunskih bolezni pri posamezniku, sta prisotnost specifičnih genov, ki pripomorejo k propadu tolerance do lastnega, in okoljski sprožilci (npr. okužbe z določenimi mikroorganizmi), ki so odgovorni za aktivacijo limfocitov, ki reagirajo z lastnim tkivom. Pomanjkanje znanja na tem področju izhaja predvsem iz dejstva, da so avtoimunske bolezni velikokrat zelo heterogene in nastanejo kot posledica delovanja več faktorjev. Na splošno je avtoimunost povezana z nastankom avtoprotiteles ali z aktivacijo celic T, ki reagirajo s telesu lastnimi antigeni (Abbas in Lichtman, 2001).



Slika 1: Prikaz predlaganih mehanizmov avtoimunosti (prirejeno po Abbas in Lichtman, 2001:165).

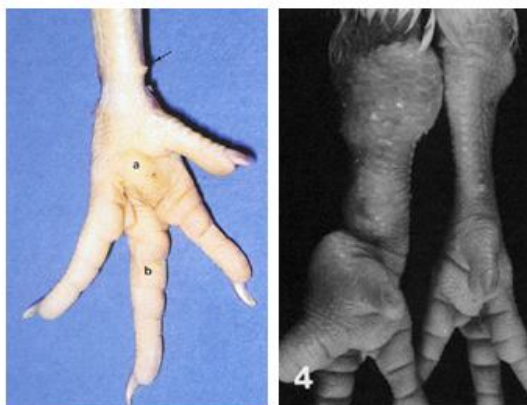
2.2.1 Vloga okužb pri nastanku avtoimunosti

Večkrat so opazili, da se pred kliničnimi manifestacijami avtoimunske poškodbe tkiv pojavijo znaki mikrobne okužbe. Okužba lahko na več načinov prispeva k razvoju avtoimunosti:

- Okužba tkiva inducira lokalni prirojeni imunski odziv, kar vodi v povišano izražanje kostimulatorjev in citokinov s strani tkivnih APC. APC nato lahko stimulirajo celice T, ki reagirajo na telesu lastne antigene.
- Nekateri patogeni mikrobi proizvajajo peptidne antigene, ki so podobni telesu lastnim antigenom in sprožijo navzkrižno reaktivnost protiteles gostitelja. Ta pojav, imenovan molekularna mimikrija, povzroči, da lahko strukturno podobni proteini gostitelja reagirajo s protitelesi, ki sicer primarno nastanejo kot odziv na prisotnost proteinov mikroorganizma.
- Ob okužbi lahko pride do poškodb tkiva, pri čemer se sprostijo telesu lastni antigeni, ki pa so v normalnih pogojih »skriti« pred imunskim sistemom. Sproščanje teh antigenov sproži imunski odziv proti lastnemu tkivu (Abbas in Lichtman, 2001).

2.2.2 Kužni sinovitis in avtoimunost

Kužni sinovitis je akutna ali kronična bolezen, ki se pojavlja pri puranih in kokoših in nastane zaradi okužbe z *M. synoviae*. Značilni znaki obolenja so vnetje sklepov, sklepnih ovojnic in ovojnic kit ter poškodbe okoliškega tkiva. Na obolelih mestih se pojavi oteklina, ki je posledica naseljevanja celic v vnetno področje. V serumu prizadetih živali je lahko prisoten revmatoidni faktor (podobno kot pri revmatoidnem artritisu pri človeku). Pride do povečanja količine in spremembe barve sinovialne tekočine in spremembe strukture tkiva (pojav edemov, eksudatov, tvorba granulacij in fibroza). V sub-sinovialnem prostoru so prisotne številne celice, makrofagi in limfociti, tudi nekaj heterofilcev. Kronične lezije (erozije v sklepnem hrustancu) se pri eksperimentalnih sistemih pojavijo šele 40 dni po okužbi (Kerr in Olson, 1970).



Slika 2: Prikaz zdravega stopala kokoši (McLelland, 1990: 14) in stopala kokoši, ki je okužena z *Mycoplasma synoviae* in pri kateri se je razvil kužni sinovitis (Lockaby in sod., 1998: 182).

Že dolgo je znano, da kužni sinovitis spremljajo očitni avtoimunski procesi (Jordan, 1985; Kleven, 2003). Podobno kot pri ljudeh, ki imajo pljučnico zaradi okužbe z *Mycoplasma pneumoniae*, se tudi pri kokoših s kužnim sinovitisom v serumu pojavijo protitelesa proti lastnim eritrocitom, t.i. hladni aglutinini (Kleven, 2003). Akutni kužni sinovitis spremlja tudi izrazita hemolitična anemija in močno znižano število eritrocitov v krvi (Kerr in Olson, 1970). Pri eksperimentalnih in naravnih okužbah z *M. synoviae* in pojavom kužnega sinovitisa se pogosto v serumih kokoši pojavi t.i. revmatoidni faktor (Morrow in sod., 1990; Sells, 1975; Jordan, 1985). V serumih so protitelesa, večinoma razreda IgM, ki se vežejo na lastne IgG v Fc delu te molekule. Dogajanja spominjajo na tista pri revmatoidnem artritisu ljudi, vendar ni znano, ali se pri kokoših pojavljajo avtoprotitelesa tudi v sinovialni tekočini vnetih sklepov. V njej se zgodaj pojavijo protitelesa proti *M. synoviae* (zlasti proti lipoproteinu MSPB), kar kaže na močan lokalni protitelesni odgovor (Narat in sod., 1998).

2.3 HRUSTANČNO TKIVO IN HONDROCITI

Hrustančno tkivo je specializirano vezivno tkivo s trdno medceličnino, ki jo tvorijo in vzdržujejo hondrociti. Deluje kot opora mehkim tkivom ter preprečuje deformacije, ki so posledica mehanske obremenitve. V nasprotju z drugimi vezivnimi tkivi hrustanec ne vsebuje krvnih in limfnih žil ter živcev. Prehrana hondrocitov poteka z difuzijo iz

okoljskega veziva, ki ga imenujemo perihondrij ali iz sinovialne tekočine pri sklepnem hrustancu (Martinčič Štiblar, 2005).

Najbolje je raziskan hrustanec pri ljudeh in ker se le-ta ne razlikuje bistveno od hrustanca ptic, se opisi v nadaljevanju nanašajo na človeka. Hrustanec kokoši sicer raziskujejo, vendar v zelo majhnem obsegu in večinoma samo v povezavi z boleznimi, ki vplivajo na produkcijo.

2.3.1 Vrste hrustanca

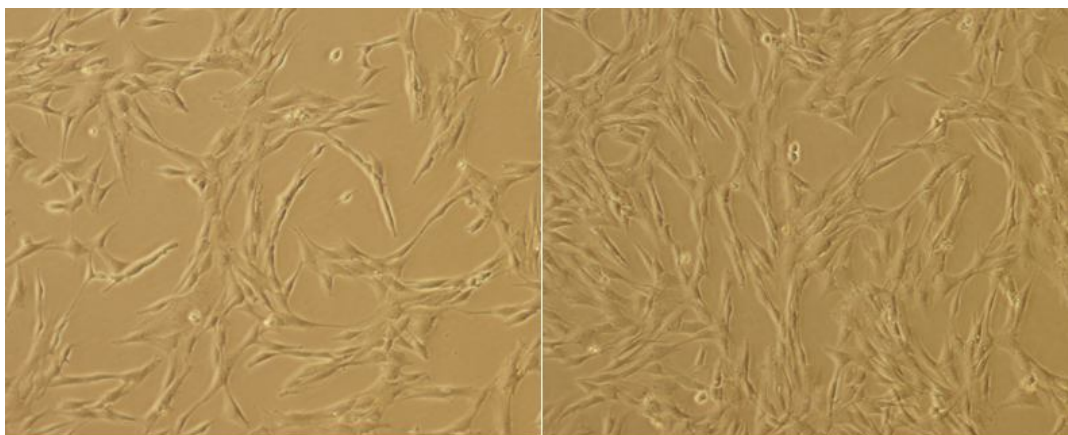
Ločimo 3 vrste hrustančnega tkiva: hialino, vezivno in elastično. Različna razmerja med molekulami v izvenceličnem matriksu dajejo različnim vrstam hrustanca specifične anatomske in fiziološke lastnosti, ki so podlaga za ločevanje v skupine. Hialini hrustanec je najbolj razširjen in se nahaja v grlu, sprednjih delih reber ob stiku s prsnico, v sapnikovih obročih in bronhijih ter na sklepnih površinah premičnih sklepov. Tvori tudi skelet v času razvoja kosti in epifizni rastni hrustanec rastoče kosti. Homogeni in amorfnosti izvencelični matriks vsebuje velike količine kolagenih vlaken in proteoglikanov. Kolagena vlakna so enakomerno porazdeljena po izvenceličnem matriksu (Seeley in sod., 1995). Vezivni (fibrilarni) hrustanec najdemo v medvretenčni ploščici, sramnični simfizi, sklepni plošči med prsnico in ključnico ter med senčnico in zgornjo čeljustnico, tvori tudi meniskusa in pokriva določene predele, kjer se ligamenti in kite vežejo na kosti. Vezivni hrustanec ni pokrit s perihondrijem. Izvencelični matriks vsebuje hondroitin sulfat in dermatan sulfat s kolagenskimi vlakni tipa I, pri čemer je delež kolagena večji od deleža proteoglikanov. Hondrociti, ki običajno izvirajo iz fibroblastov, ležijo v lakunah vzporedno s svežnji debelih, grobih kolagenskih vlaken, ki potekajo v smeri natezanja. Elastični hrustanec se nahaja v zunanjem sluhovodu, ušesni troblji, poklopcu in ščitastem hrustancu grla. Po zgradbi je podoben hialinemu hrustancu, v izvenceličnem matriksu pa je poleg kolagenskih vlaken še gosto omrežje elastičnih vlaken elastina, ki je posebno gosto okrog celic. Razvejana elastična vlakna se vrivajo med svežnje kolagenskih vlaken tipa II in tako prispevajo k večji elastičnosti tkiva. Hondrociti elastičnega hrustanca so številnejši in večji v primerjavi s hondrociti hialinega. Izvencelični matriks s starostjo ne kalcificira. Na površini je vezivni perihondrij (Martinčič Štiblar, 2005).

2.3.2 Zgradba pravega sklepa

Sklepe ali stike med sosednjimi kostmi po sposobnostih premikanja delimo na prave in neprave. Pravi sklepi so pokriti s sklepnim hrustancem (vrsta hialinega hrustanca) in omogočajo premikanje povezanih kosti. Naloga sklepnega hrustanca je omogočiti čim manjše trenje dveh sklepnih površin ter s prerazporejanjem sil ublažiti obremenitve na kosti. Sklep obdaja sklepna ovojnica, ki je zgrajena iz dveh plasti. Od hialinega hrustanca se sklepni hrustanec razlikuje po tem, da ga ne pokriva perihondrij in da vsebuje tudi kolagenska vlakna tipa I. Sklepni hrustanec je brez žil. Prehranjuje se z difuzijo iz sinovialne tekočine. Za normalen metabolizem hondrocitov je nujno stalno gibanje sklepa, ki premika vodo in v njej raztopljene metabolite po hrustancu in s tem olajša difuzijo (Martinčič Štiblar, 2005).

2.3.3 Zgradba in funkcija hondrocitov

Hrustančne celice so porazdeljene znotraj matriksa, in zavzemajo le 1-5 % volumna hrustančnega tkiva. Zanje je značilno, da med njimi ni medceličnih stikov (podobno kot pri osteocitih) in da so specializirane za izločanje in vzdrževanje hrustančnega matriksa, saj sintetizirajo molekule kolagena, proteoglikane in nekolagenske proteine, ki tvorijo matriks. Hranila prejemajo z difuzijo in so prilagojene na življenje pri nizkih koncentracijah kisika (Bhosale in Richardson, 2008).



Slika 3: Primarna kultura kokošnjih hrustančnih celic, gojenih *in vitro*, kot videna pod invertnim mikroskopom na 100-kratni povečavi.

2.3.4 Izvencelični matriks sklepnega hrustanca

Izvencelični matriks je skupek vode, proteinskih in neproteinskih molekul, ki jih izločajo mlade in zrele hrustančne celice. Osnovne makromolekule, prisotne v medceličnini vseh treh vrst hrustanca, so kolagen, hialuronska kislina, proteoglikani in manjše količine različnih glikoproteinov. Je zelo pomemben del hrustančnega tkiva, saj ščiti hondrocite pred mehanskimi pritiski, pomaga ohranjati njihovo vlogo, predstavlja skladišče za številne citokine in rastne faktorje, ki jih hrustančne celice potrebujejo za rast in razvoj, določa hitrost difuzije hranilnih snovi do celic in deluje kot medij za prenos signalov. Deformacije matriksa tvorijo mehanske, električne in kemične signale, ki vplivajo na delovanje hondrocitov. Z leti se sestava medceličnine spreminja, hondrociti pa izgubijo sposobnost odzivanja na spremembe, ki je ključna za ohranjanje aktivnega tkiva (Bhosale in Richardson, 2008).

2.3.4.1 Kolageni

Izvencelični matriks sklepnega hrustanca vsebuje do 40 % kolagena. Kolagen je glavna beljakovina matriksa. Največ je kolagenskih vlaken tipa II, v manjših količinah so prisotna tudi kolagenska vlakna tipov I, IX, X in XI. Kolagenska vlakna tipa II so tanka in urejena v manjših svežnjih, katerih debelina narašča v oddaljenosti od lakune hondrocita. Urejenost vlaken je v skladu s smerjo pritiskov na hrustanec. Pri sklepnem hrustancu so npr. vlakna bliže površini hrustanca urejena vzporedno s površino, medtem ko so globlje ležeča bolj valovita (Martinčič Štiblar, 2005; Bhosale in Richardson, 2008).

2.3.4.2 Proteoglikani

Proteoglikani so proteinsko-polisaharidne molekule, ki predstavlja 10-20 % teže hrustanca in ustvarjajo kompresijsko moč tkiva. Poznamo 2 glavna razreda proteoglikanov – veliki agregirajoči proteoglikanski monomeri (agrekani) in majhni proteoglikani (dekorin, biglikan in fibromodulin). Nastajajo znotraj hondrocitov in se izločajo v matriks. Podenote proteoglikanov so glikozaminoglikani (GAG). To so disaharidne molekule z dvema tipoma molekul – hondroitin sulfatom in keratin sulfatom. Glikozaminoglikani so vezani na proteinsko jedro preko sladkornih vezi. Vezni protein stabilizira verigo z vezavo centralne

hialuronske kisline. Izguba agrekana je v eksperimentalnih modelih zgodnji pokazatelj artritisa. Proteoglikani vzdržujejo tekočinsko in elektrolitsko ravnotežje v hrustancu. Makromolekule imajo negativno nabite sulfatne in karboksilne skupine, ki privlačijo samo pozitivno nabite delce, s čimer se povečuje koncentracija anorganskih ionov (npr. Na^+) znotraj matriksa, kar vodi v povišano osmolarnost (Martinčič Štiblar, 2005; Bhosale in Richardson, 2008).

2.3.4.3 Voda

Izvencelični matriks vsebuje 65 do 80 % vode. Večina molekul vode je tesno vezana na proteoglikanske agregate, kar daje hrustancu prožnost. Nekaj vode je rahlo vezane in preko te poteka difuzija metabolitov od in do celic. V sklepnem hrustancu potekajo občasne in prostorske spremembe v količini vode. Do sprememb pride pri gibanju sklepa in pri pritiskih na sklep. Voda torej omogoča deformacije hrustanca kot odziv na zunanje pritiske (Martinčič Štiblar, 2005; Bhosale in Richardson, 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PRIPRAVA MATERIALA

3.1.1 Hondrociti

Hrustančne celice so bile že predhodno izolirane iz kokošjega hrustančnega tkiva in zamrznjene v tekočem dušiku (Dušanić in sod., 2009) (celična zbirka Laboratorija za imunologijo in celične kulture, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko). Pred začetkom postopka odmrzovanja smo v vodni kopeli segreti gojišče za hondrocite (Preglednica 2) na 37°C. Posodico z zamrznjenimi kokošjimi hondrociti v 1. ali 2. pasaži smo vzeli iz posode s tekočim dušikom. S pipeto smo v centrifugirko dodali 1 ml gojišča (37°C) in celice prenesli v centrifugirko. Celice smo centrifugirali 5 minut na 1300 rpm pri sobni temperaturi. Odstranili smo supernatant ter celično usedlino resuspendirali v 2 ml svežega medija. Celično suspenzijo smo prenesli v gojitveno posodo, kamor smo že predhodno odpipetirali 5 ml gojitvenega medija, le-to pa smo postavili v CO₂ inkubator s temperaturo 37°C in 5 % CO₂.

Preglednica 2: Sestava gojišča za gojenje celične kulture kokošjih hondrocitov.

90 % DMEM
7,5 % FBS
2,5 % kokošji serum

Za štetje hondrocitov smo uporabili standardno metodo štetja pod mikroskopom z uporabo tripanskega modrila (Sigma, Trypan Blue solution). 20 µl vzorca celic smo zmešali z 20 µl tripanskega modrila, premešali in nanесли na Bürker-Türk števno komoro, prešteli celice in izračunali število celic v celični suspenziji po naslednji formuli (1):

$$\text{Skupno število celic} = \bar{x} \times R \times V_K \times 10^4 \quad \dots (1)$$

\bar{x} – povprečno število prešteti celic v vseh štirih kvadratkih Bürker-Türk števne komore

R – redčitveni faktor zaradi mešanja vzorca celic s tripsanskim modrilom (v našem primeru redčitev 1:1)

V_K – volumen celične suspenzije

10^4 – volumen vzorca v števeni komori je 1×10^{-4} ml, zato ta faktor omogoča, da izrazimo koncentracijo celic v 1 ml

Kulturo smo redno dohranjevali s svežim medijem. Ko je celična kultura dosegla vsaj 80 % konfluenco, smo celice presadili in jih hkrati razredčili. Celice smo sprali z 10 ml HBSS. V posodico smo nato dodali 5 ml 0,05 % tripsina (redčenje v HBSS) in jo postavili v inkubator za približno 4 minute. Vmes smo v čisto centrifugirko odpipetirali enako količino gojišča za celice (kalcijevi ioni v gojitvenem mediju inhibirajo delovanje tripsina). Posodico smo vzeli iz inkubatorja, mehansko pretresli in pod invertnim mikroskopom pregledali ali so se vse celice odlepili od podlage. Celotno vsebino gojitvene posodice smo odpipetirali v pripravljeno centrifugirko z medijem in le-to centrifugirali 5 min na 1300 rpm. Odsesali smo supernatant, ki je vseboval odvečen medij s tripsinom in mrtve celice, celično usedlino pa smo resuspendirali v nekaj ml medija, jo prenesli v dve novi gojitveni posodici ter vsako dopolnili do skupnega volumna 7 ml s hranilnim medijem. Označeni posodici smo postavili nazaj v CO₂ inkubator.

Za potrebe poskusov smo kokošje hondrocite iz več gojitvenih posodic združili. Iz suspenzije celic smo odpipetirali toliko vzorca, da je bila končna koncentracija celic v vzorcu za nanos na gel 5×10^5 celic. Želeni volumen celic smo dali v novo 1,5 ml epico in centrifugirali, da smo odstranili medij. Dobljeno usedlino smo resuspendirali v 5 ml PBS pufra in ponovno centrifugirali, s čimer smo sprali ostanke gojitvenega medija. Usedlino smo zmešali s 40 µl mešanice pufra za lizo celic (IP Lysis Buffer – 10 mM TRIS pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % NP-40, 0,5 M EDTA, dopolnili z destilirano vodo) in inhibitorjev proteaz (Sigma, Protease Inhibitor Cocktail). To je bil vzorec celic, ki smo ga uporabili za ločitev na SDS gelu. Do uporabe smo vzorec shranili v zamrzovalniku na -20°C.

3.1.2 Hrustančno tkivo

Hrustančno tkivo kokoši je bilo odvzeto iz sklepa, kot je opisano (Dušanić in sod., 2009) in zamrznjeno. Tkivo smo odmrznili in ga najprej mehansko obdelali: s skalpelom smo ga narezali na koščke, jih dali v terilnico in prelili s tekočim dušikom ter strli s pestilom, da smo dobili prah tkiva. Fine delce tkiva smo prenesli v 1,5 ml epico. Nato smo izvedli encimsko razgradnjo tkiva.

Pred encimsko razgradnjo hrustančnega tkiva smo morali ugotoviti, kakšna kombinacija encimov bo zagotovila ustrezno stopnjo razgradnje za uporabo vzorca hrustančnega tkiva na poliakrilamidnem gelu. Strto hrustančno tkivo smo razdelili v tri epice. V prvo epico nismo dodali encimov za razgradnjo, v drugo epico smo dodali encim hialuronidazo (Sigma, Hyaluronidaze Type VIII), v tretjo pa mešanico encimov hialuronidaze in kolagenaze II (Sigma, Collagenase Type II-s). Inkubacija hrustančnega tkiva je potekala 24 ur v inkubatorju. Vse tri vzorce smo naložili na posamezne steze na akrilamidnem gelu ter jih po končani elektroforezi prenesli na membrano PVDF. Po barvanju membrane z barvilom Coomassie Brilliant Blue smo ugotavljali kakšna je bila uspešnost razgradnje hrustančnega tkiva s posamezno mešanico in ugotovili, da je bila najbolj uspešna razgradnja s kombinacijo obeh encimov.

Encimska mešanica za razgradnjo je vsebovala hialuronidazo (v končni koncentraciji 1 mg/ml) in kolagenazo II (v končni koncentraciji 1 mg/ml). 150 µl encimske mešanice smo dodali v epico s tkivom in dopolnili do 1 ml s pufrom PBS. Tkivo smo v encimski raztopini inkubirali 24 ur pri temperaturi 37°C. To je bil vzorec, ki smo ga uporabili pri SDS-PAGE elektroforezi. Do uporabe smo vzorec shranili v zamrzovalniku na -20°C. Pri poskusih smo uporabili 3 vzorce hrustančnega tkiva z oznakami T1, T12 in T13 (glej tudi poglavje 3.1.4 za utemeljitev uporabe izbranih vzorcev).

3.1.3 Kolagen

Poleg hrustančnega tkiva in celic, smo za imunodetekcijo pripravili še vzorce kokošjega kolagena tipa II (Sigma-Aldrich, chicken collagen type II), razgrajene v različnih encimskih mešanica. Na gel smo nanesti po 3 ponovitve naslednjega zaporedja vzorcev:

- kolagen (inkubacija 24h v inkubatorju, vzorec redčen v PBS) – oznaka k
- kolagen s kolagenazo (dodatek encima kolagenaze v koncentraciji 1 mg/ml, inkubacija 24h v inkubatorju, kjer je potekala razgradnja kolagena, redčitev vzorca v PBS) – oznaka k+k
- kolagen s hialuronidazo (dodatek encima hialuronidaze v koncentraciji 1 mg/ml, inkubacija 24h v inkubatorju, kjer je potekala razgradnja kolagena, redčitev vzorca v PBS) – oznaka k+h

To so bili vzorci, ki smo jih uporabili pri SDS-PAGE elektroforezi. Do uporabe smo vzorce shranili v zamrzovalniku na -20°C.

3.1.4 Kokošje sinovialne tekočine

Ugotoviti smo želeli, ali so v serumih in sinovialnih tekočinah kokoši, ki so bile okužene z *M. synoviae* prisotna protitelesa, ki reagirajo z epitopi na proteinih hrustančnega tkiva, hrustančnih celic ali kolagena. Zato smo proteinske profile na membranah izpostavili serumom in sinovialnim tekočinam kokoši oz. piščancev, ki so bili okuženi z *M. synoviae*, za kontrolo pa smo uporabili tudi serume in sinovialne tekočine živali, ki niso bile okužene z *M. synoviae*.

Za izbor vzorcev, ki smo jih uporabili v nadaljnjih poskusih, smo na akrilamidni gel nanesti nerazredčene vzorce sinovialnih tekočin iz neokuženih živali z oznakami ST1, ST7, ST12 in ST13. Nerazredčeni vzorci sinovialnih tekočin niso dali dobrih rezultatov, zato smo v drugem poskusu uporabili iste vzorce v redčitvah 1:10 in 1:50 (redčenje s PBS). Poleg tega, da smo določili, da je za poskuse uporabna redčitev vsaj 1:50 (lahko tudi več, odvisno od količine vzorca, ki smo ga imeli na razpolago za poskuse, glej preglednico 4),

smo določili še, da bomo za glavni poskus uporabili vzorce sinovialnih tekočin neokuženih živali z oznakami ST1, ST12 in ST13. Na podlagi te odločitve smo izbrali tudi vzorce hrustančnega tkiva in neokužene serume istih živali (torej tkiva T1, T12 in T13 ter serumi S1, S12 in S13).

Poleg sinovialnih tekočin neokuženih živali smo uporabili tudi sinovialne tekočine kokoši oz. piščancev, ki so bili naravno ali eksperimentalno okuženi z *M. synoviae*. Uporabljene sinovialne tekočine imajo oznake JAHO-1 (iz sklepa naravno okužene kokoši), MS-1 (kokoš okužena s sevom F10-2AS *M. synoviae* 1) in MS-3 (kokoš okužena s sevom F10-2AS *M. synoviae* 3). Vzorca sinovialne tekočine MS-1 in MS-3 sta bila odvzeta 12 dni po inokulaciji seva F10-2AS v skočni sklep. Kužni sinovitis je bil opažen že 8 dni po inokulaciji (otekli sklep), iz sinovialne tekočine pa izolirana *M. synoviae*. Vzorca MS-1 in MS-3 sta izpirka skočnega sklepa s ~5 ml PBS.

3.1.5 Kokošji serumi

Izbor ustreznih serumov iz neokuženih živali (oznake S1, S12 in S13) je bil povezan z izborom vzorcev sinovialnih tekočin (glej poglavje 3.1.4). Poleg tega smo za poskuse uporabili tudi seruma kokoši in piščanca, ki sta bila okužena z *M. synoviae*. Oznaki teh dveh vzorcev sta JAHO-1 (naravna okužba kokoši) in serum št. 4 (eksperimentalna okužba, serum odvzet 12 dni po inokulaciji piščanca s sevom F10-2AS). Uporabljene redčitve serumov (in sinovialnih tekočin) so prikazane v preglednici 4.

3.2 ANALIZA WESTERN

3.2.1 SDS-PAGE elektroforeza

SDS-PAGE elektroforezo smo izvedli z uporabo aparature Dual Gel Caster, Mighty Small (Hofer) po standardnem postopku (Harlow in Lane, 1988). Najprej smo sestavili napravo za gel (»sendvič«, slika 3). Z destilirano vodo in 70 % etanolom smo očistili steklo, aluminijasto ploščico, distančnike in glavnik. Med steklo in ploščico smo vstavili distančnike in vse skupaj poravnali ter vstavili v plastični okvir. Počasi in previdno smo

zategnili vijake, na dno modelčka smo za boljše tesnjenje dali parafilm. Celoten okvir smo vstavili v stojalo in ob straneh dobro zategnili plastična vijaka. Med steklo in aluminijasto ploščico smo odpipetirali nekaj ml destilirane vode, da smo preverili, če naprava dobro tesni, nato pa jo odlili in dobro popivnali odvečno tekočino.

Nato smo pripravili poliakrilamidni gel, ki je bil sestavljen iz spodnjega, 15 % ločevalnega gela in zgornjega, 4 % nanašalnega gela (sestava je opisana v preglednici 3).

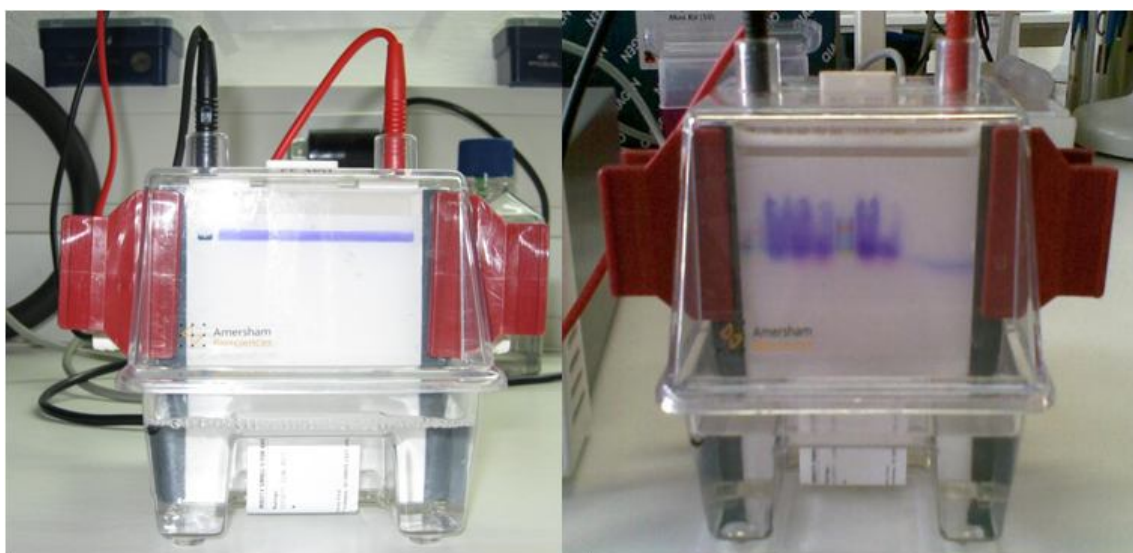
Preglednica 3: Razmerja sestavin v ločevalnem in nanašalnem gelu.

Sestavina	Ločevalni gel (za 15 ml)	Nanašalni gel (za 4 ml)
Destilirana voda	3,500 ml	2,200 ml
Akrlamid mix (Sigma, Acrylamide/bis-acrylamide 30 % solution)	7,500 ml	0,670 ml
TRIS	3,800 ml (1,5 M, pH 8,8)	1,000 ml (0,5 M, pH 6.8)
SDS (Sigma, SDS for electrophoresis, approx. 99 %)	0,150 ml	0,040 ml
APS (Sigma, APS for electrophoresis, ≥ 98 %)	0,150 ml	0,040 ml
TEMED (Sigma, TEMED for electrophoresis, approx. 99 %)	0,006 ml	0,006 ml

Najprej smo s pipeto nanесли ločevalni gel. Na vrh smo dodali približno 1 ml z vodo nasičenega n-butanola, s pomočjo katerega smo ugotovili, kdaj se je gel strdil. Pred nanašanjem drugega gela smo ga odlili. Strjevanje ločevalnega gela je potekalo približno 40 minut. Nato smo nanесли še nanašalni gel in vstavili glavniček z zelenim številom žepkov. Uporabili smo glavniček z dvema stezama (ožja za označevalec molekulskih mas in širša za vzorec, izjemoma smo za vzorce kolagena uporabili glavniček z desetimi stezami). Nanašalni gel se je strjeval 20 minut.

Gel smo skupaj s stekelci in distančniki vstavili v posodo za elektroforezo, ga pritrdili s plastičnimi sponkami in posodo napolnili z SDS pufrom. Želeni volumen vzorca hrustančnega tkiva, hondrocitov ali kolagena smo zmešali z nalagalnim pufrom (20 volumskih %) (Fermentas, 5X Loading Buffer) in DTT (5 volumskih %) (Fermentas, 20X

Reducing Agent). Mešanico smo za 2 minuti postavili v vodno kopel na 100°C. Previdno smo odstranili glavniček iz zgornjega gela in na prvo stezo nanесли 7 μ l molekulskega označevalca z molekulskimi masami 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17 in 10 kDa (Fermentas, Page Ruler™ Prestained Protein Ladder), na drugo pa 270 μ l vzorca hrustančnega tkiva ali celic oz. po 30 μ l ustreznega vzorca kolagena. Posodo smo priklopili na električni napajalnik. Ločevanje vzorca na gelu je potekalo pri sobni temperaturi in napetosti 100 V, dokler ni fronta dosegla konca nanašalnega gela (približno 20 minut). Nato smo povišali električno napetost na 130 V in pustili, da je elektroforeza potekala dokler ni fronta barvila dosegla dna gela (približno dve uri). Po koncu elektroforeze smo stekelca z gelom vzeli iz posode in vse skupaj shranili v hladilniku do naslednjega dne ali pa gel takoj uporabili za prenos na membrano.



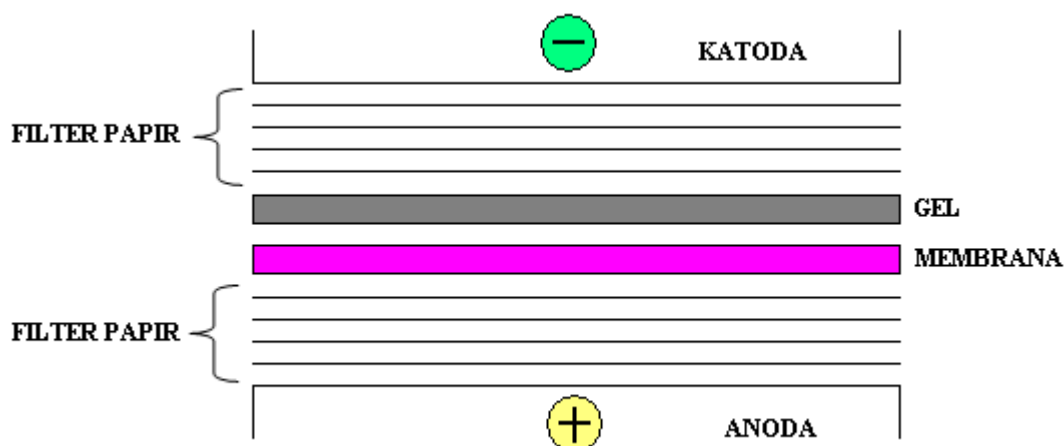
Slika 4: Prikaz poteka SDS-PAGE elektroforeze.

3.2.2 Prenos proteinov na membrano

Po končani elektroforezi smo izvedli prenos proteinov na membrano (Berčič in sod., 2008a). Previdno smo ločili steklo in ploščico, da smo dobili gel, na katerem so bili ločeni proteini iz tkiva oz. celic ali kolagen. Nanašalni gel smo odrezali s skalpelom ter z ravnilom izmerili ločevalni gel. V spodnjem desnem kotu smo naredili majhno zarezo kot oznako za pravilno orientacijo gela. Izrezali smo 8 filter papirjev in 1 membrano PVDF

(Millipore, Immobilon-P, 0,45 μm) v enakih dimenzijah kot gel. Tudi membrane smo označili v spodnjem desnem kotu. Gel smo za 5 minut potopili v pufer EBP (100 ml 10x CAPS, 100 ml 100 % metanola, do končnega volumna 1 liter dopolnili z destilirano vodo), membrano pa smo pred prenosom aktivirali v 100 % metanolu (nekaj sekund).

Anodno ploščo smo omočili s pufrom EPB in nanjo položili 4 filter papirje, ki smo jih predhodno prav tako namočili v pufru EBP (kot prikazuje slika 5). Iztisnili smo zračne mehurčke izmed plasti papirja. Po aktivaciji membrane v 100 % metanolu, smo jo sprali v pufru EBP, položili na filter papirje in znova iztisnili vse mehurčke. Na membrano smo položili gel, pri čemer smo pazili na pravilno orientacijo. Na vrh smo dali še 4 omočene filter papirje, iztisnili vse mehurčke in »sendvič« pokrili s katodno ploščo.



Slika 5: Prikaz razporeditve filter papirjev, membrane in gela glede na naboj plošče za prenos proteinov iz gela na membrano.

Jakost električnega toka, potrebna za prenos proteinov iz gela na membrano, smo določili s pomočjo enačbe (2):

$$I = 0,8 \text{ mA} \times P_{\text{membrane}} \quad \dots (2)$$

pri čemer je P površina membrane. Prenos je trajal 50 minut, saj smo tako lahko zagotovili prenos proteinov visokih in nizkih molekularnih mas.

Pri vzorcih kolagena smo po končani elektroforezi gel prerezali horizontalno in izvedli ločen prenos proteinov na membrano PVDF (prenos je potekal 1 uro za zgornji del gela – večje molekulske mase in 40 minut za spodnji del gela – manjše molekulske mase).

Po končanem prenosu smo odrezali del membrane, na katerem je bil molekulski označevalec in cca 0,5 cm široko stezo s proteini ter jo pobarvali z barvilom Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich, Brilliant Blue R), da smo videli, ali je prenos proteinov uspel in kakšen je proteinski profil tkiva oz. celic. Membrano smo najprej sprali v destilirani vodi, jo nato za nekaj sekund potopili v 100 % metanol ter potopili v barvilo Coomassie za nekaj minut, nato pa predstavili v 50 % metanol, ki je služil za razbarvanje ozadja. Po končanem razbarvanju smo membrano posušili na zraku in ustrezno spravili.

3.2.3 Imunodetekcija

3.2.3.1 Test DIBA

Da bi preverili ustreznost konjugata, ki smo ga želeli uporabiti pri označevanju reakcij na membranah, smo naredili test DIBA. Izrezali smo kvadrat membrane PVDF in nanj narisali mrežo 4×4 kvadratkov (0,5 cm x 0,5 cm). Membrano smo aktivirali v 100 % metanolu in nato sprali v destilirani vodi ter posušili. Na posamezne kvadratke smo nanесли po 3 µl posamezne redčitev kokošnjega seruma (1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000, redčenje s PBS). Ko se je membrana posušila, smo jo potopili v raztopino za blokiranje prostih veznih mest (0,5 % Tween-PBS) za 30 minut. Potem smo membrano narezali na 4 trakove (na vsakega smo nanесли eno razredčino posameznega seruma), ki smo jih 45 minut inkubirali v 3 različnih redčitvah konjugata (1:50, 1:100, 1:200) (Sigma, Rabbit anti Chicken IgG HRP, A-9046, končna redčitev 1:2000) in raztopini pufru PBS (negativna kontrola). Po inkubaciji smo trakove membrane spirali v 0,05 % Tween-PBS (1 × 1 minuto, 3 × 5 minut) in enkrat v pufru PBS. Na membrane smo nanесли substrat TrueBlue (KPL, TrueBlue™ Peroxidase Substrate) in počakali do razvoja barve. Glede na rezultat smo se odločili, da bomo v nadaljnjih poskusih uporabili redčitev seruma 1:100.

3.2.3.2 Reakcije proteinov s kokošnjimi protitelesi

Imunodetekcijo smo opravili na membranah, na katere so bili nanešeni proteini hrustančnih tkiv (T1, T12 in T13), proteini hondrocitov ter kolagen. Inkubacija v ustreznih serumih in sinovialnih tekočinah je potekala kot je prikazano v Preglednici 4.

Preglednica 4: Pregled uporabljenih vzorcev in njihovih oznak: serumih in sinovialne tekočine okuženih in neokuženih živali ter hrustančna tkiva, hondrociti in kolagen.

		Redčitev*	Hrustančno tkivo			Hondrociti	Kolagen
			T1	T12	T13		
Serumi	S1	1:100	+			+	
	S12	1:100		+		+	
	S13	1:100			+	+	
	JAHO-1	1:100	+	+	+	+	
	ŠT. 4	1:100	+	+	+	+	+
Sinovialne tekočine	ST1	1:100	+			+	
	ST12	1:100		+		+	
	ST13	1:100			+	+	
	JAHO-1	1:100	+	+	+	+	
	MS-1**	1:10	+	+	+	+	+
	MS-3**	1:10	+	+	+	+	+

* vsi serumih in sinovialne tekočine so bili redčeni v 0,05 % Tween-PBS

** vzorca sta »izpirka« skočnih sklepov piščancev okuženih z *M. synoviae* F10-2AS, odvzeta 12 dni po okužbi; sklepa sta bila »izprana« s 5 ml PBS, zato smo vzorca redčili le še 1:10

Membrano s proteini smo razrezali na 10 trakov, da smo lahko enake vzorce proteinov inkubirali v različnih vzorcih ST ali serumov. Trakove smo najprej pomočili v 100 % metanol za nekaj sekund, nato smo jih dvakrat po 5 minut spirali v destilirani vodi. Trakove smo 1 uro inkubirali v pufri za blokiranje prostih veznih mest (3 % mleko v prahu v raztopini TRIS-Tween/0,05 M TRIS-HCl, 0,15 M NaCl, 0,1 % Tween 20, umerili na pH 7,5 pred dodatkom mleka v prahu) in nato še 1 uro v ustreznem serumu oz. sinovialni tekočini. Sledilo je spiranje v 0,05 % Tween-PBS (1 × 1 minuto, 3 × 5 minut), 45-minutna inkubacija v označenih protitelesih (Sigma, Rabbit anti Chicken IgG HRP, a-9046, končna redčitev 1:2000), ponovno spiranje v 0,05 % Tween-PBS (1 × 1 minuto, 3 × 5 minut) in končno še spiranje v destilirani vodi. Na posušene trakove smo nanесли ~ 300 ml substrata

TrueBlue in počakali do pojava reakcije (modro obarvanje). Na koncu smo trakove membran pomočili v destilirano vodo in s tem zaustavili reakcije.

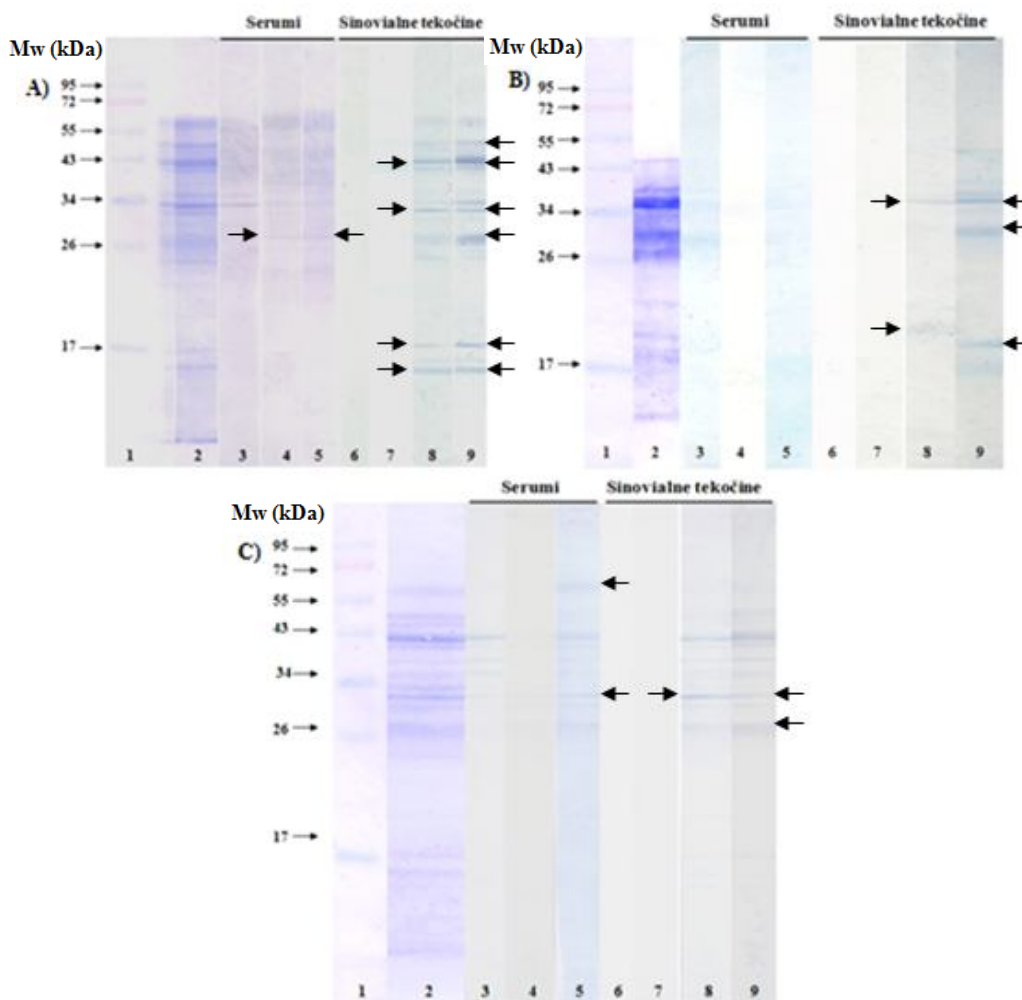
3.3 OBDELAVA REZULTATOV

Vse membrane, s katerimi smo izvedli barvanje proteinov ali imunodetekcijo, smo skenirali in slike obdelali v programih Photoshop CS4 in Microsoft Office Word. Tako smo lahko razrezane membrane spojili v eno sliko, kar je olajšalo interpretacijo rezultatov.

4 REZULTATI

4.1 REAKCIJE PROTEINOV IZ HRUSTANČNEGA TKIVA Z AVTOPROTITELESI

Proteine hrustančnega tkiva vzorcev T1, T12 in T13 smo ločili z SDS poliakrilamidno gelsko elektroforezo (trije ločeni geli) ter jih prenesli na membrano PVDF. Trakove razrezane membrane smo najprej inkubirali v ustreznih serumih ali sinovialnih tekočinah neokuženih in okuženih kokoši in piščancev, nato pa še v označenih protitelesih proti kokošjim IgG. S tem smo želeli preveriti ali so v serumih in sinovialnih tekočinah okuženih živali prisotna avtoprotitelesa, ki reagirajo s proteini hrustančnega tkiva T1, T12 ali T13. Rezultati so prikazani na sliki 6. Pri vseh treh tkivih (T1, T12 in T13) smo del membrane z molekularnim označevalcem in proteinskim profilom tkiva pobarvali z barvilom Coomassie Brilliant Blue, da smo lahko ocenili uspešnost prenosa proteinov na membrano. Pozitivne reakcije – obarvani proteini, vidni kot modre lise na membrani – pomenijo, da so bila v serumih ali sinovialnih tekočinah prisotna protitelesa, ki so se vezala na epitop(e) teh proteinov. Serumi in sinovialne tekočine, ki so izhajali iz z *M. synoviae* neokuženih kokoši, so služili kot primerjalna kontrola.



Legenda:

Steza 1: Molekularni označevalec (Fermentas, Page Ruler™ Prestained Protein Ladder).

Steza 2: Proteini hrustančnega tkiva, pobarvani z barvilom Coomassie Blue.

Steza 3: Membrana s proteini hrustančnega tkiva, inkubirana v serumu neokužene kokoši (A-S1, B-S12, C-S13).

Steza 4: Membrana s proteini hrustančnega tkiva, inkubirana v serumu JAHO-1 (A, B, C).

Steza 5: Membrana s proteini hrustančnega tkiva, inkubirana v serumu št. 4 (A, B, C).

Steza 6: Membrana s proteini hrustančnega tkiva, inkubirana v sinovialni tekočini neokužene kokoši (A-ST1, B-ST12, C-ST13).

Steza 7: Membrana s proteini hrustančnega tkiva, inkubirana v sinovialni tekočini JAHO-1 (A, B, C).

Steza 8: Membrana s proteini hrustančnega tkiva, inkubirana v sinovialni tekočini MS-1 (A, B, C).

Steza 9: Membrana s proteini hrustančnega tkiva, inkubirana v sinovialni tekočini MS-3 (A, B, C).

Slika 6: Reakcije proteinov iz razgrajenih hrustančnih tkiv T1 (slika A), T12 (slika B) in T13 (slika C) s protitelesi, ki so prisotna v serumih ali sinovialnih tekočinah kokoši, ki so bile naravno ali eksperimentalno okužene z *Mycoplasma synoviae*. Serumi in sinovialne tekočine neokuženih kokoši so uporabljeni kot primerjalna kontrola. Na drugi stopnji testa so bila uporabljena kunčja protitelesa proti kokošjim IgG, konjugirana s peroksidazo in nato dodan substrat TrueBlue.

Prenos proteinov na membrano je bil uspešen pri vseh treh vzorcih tkiv (T1, T12 in T13), zajeli smo proteine molekulskih mas 10-80 kDa. Reakcije proteinov hrustančnega tkiva z IgG v serumih ali sinovialnih tekočin kokoši, ki niso bile okužene z *M. synoviae*, so služile kot primerjalna kontrola (slika 6, stezi 3 in 6, velja za A, B in C). S serumi ali sinovialnimi tekočinami neokuženih živali nismo pričakovali reakcij, vendar je s serumoma S1 in S13 prišlo do reakcije s proteini hrustančnega tkiva (slika 6, steza A3 in C3). Pri inkubaciji membran v sinovialnih tekočinah neokuženih kokoši nismo opazili, da bi se IgG protitelesa vezala na proteine hrustanca.

S serumom JAHO-1 (iz okužene kokoši), smo zaznali samo reakcijo s proteinom molekulske mase okoli 28 kDa v hrustancu vzorca T1. S serumom št. 4, odvzetem piščancu 12 dni po okužbi s sevom F10-2AS, pa smo pri inkubaciji tkiva T1 dokazali eno reakcijo (protein molekulske mase okoli 28 kDa), pri vzorcu T13 pa reakciji protiteles s proteinoma molekulske mase okoli 30 in 60 kDa (slika 6, steze A4, A5 in C5).

Po inkubaciji v sinovialni tekočini JAHO-1 nismo pri nobenem vzorcu hrustančnega tkiva zaznali vezave protiteles. Relativno veliko reakcij pa smo dokazali s protitelesi sinovialnih tekočin MS-1 in MS-3. Vzorca MS-1 in MS-3 sta bila »izpirka« skočnih sklepov dveh piščancev, ki sta bila okužena z *M. synoviae* seva F10-2AS. Vzorca sta bila odvzeta v akutni fazi sinovitisa in sicer 12 dni po inokulaciji *M. synoviae* v skočni sklep. Za sinovialno tekočino MS-1 smo dokazali reakcijo protiteles s štirimi proteini pri tkivu T1 (molekulske mase okoli 15, 17, 30 in 43 kDa, steza A8), reakcijo z dvema proteinoma pri tkivu T12 (molekulska masa okoli 20 in 36 kDa, steza B8) in eno reakcijo pri tkivu T13 (molekulska masa okoli 30 kDa, steza C8). Pri sinovialni tekočini MS-3 smo določili več reakcij, saj smo zaznali reakcijo protiteles s šestimi proteini pri tkivu T1 (molekulske mase okrog 15, 17, 26, 30, 43 in 50 kDa, steza A9), s tremi proteini pri tkivu T12 (molekulske mase približno 19, 28, 36 kDa, steza B9), in z dvema proteinoma pri tkivu T13 (molekulski masi okoli 26 in 30 kDa, steza C9).

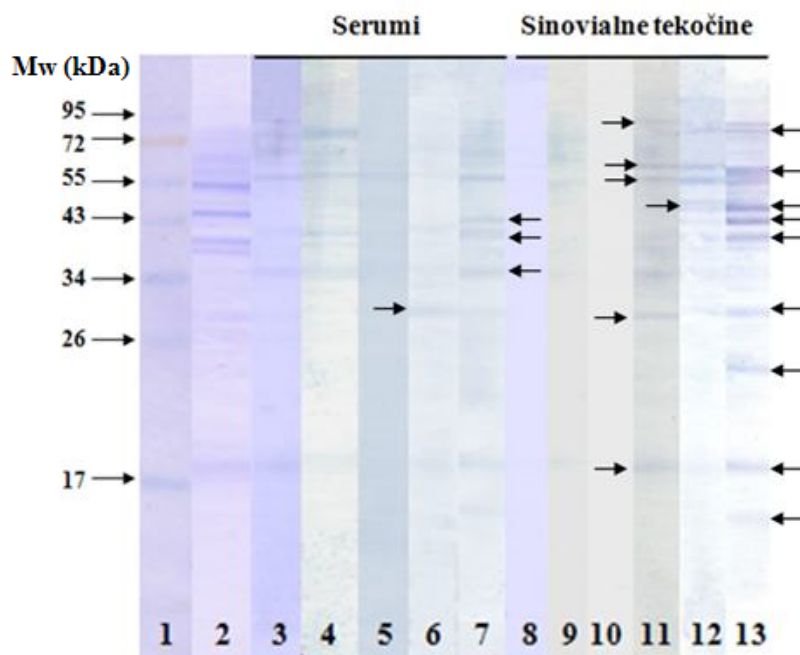
Okužba z *Mycoplasma synoviae* povzroča pri kokoših infekcijski sinovitis, ki ga spremljajo znaki avtoimunske bolezni. Verjetno so bili v razgrajenih hrustančnih tkivih T1, T12 in T13 prisotni tudi proteini, ki so reagirali z avtoprotitelesi. Več takih protiteles je

bilo v sinovialni tekočini, saj je imunski odziv na prisotnost bakterije v sklepu lokalni dogodek.

4.2 REAKCIJE PROTEINOV KOKOŠJIH HONDROCITOV S KOKOŠJIMI IgG PROTITELESI

Proteine hondrocitov smo ločili z SDS poliakrilamidno gelsko elektroforezo in jih prenesli na membrano PVDF. Na trakove razrezano membrano smo najprej inkubirali v ustreznih serumih ali sinovialnih tekočinah neokuženih in okuženih kokoši, nato pa še v označenih sekundarnih protitelesih. S tem smo želeli preveriti, ali so v serumih in sinovialnih tekočinah okuženih živali prisotna protitelesa, ki reagirajo s proteini hondrocitov. Rezultati so prikazani na sliki 7. Enako kot pri tkivih smo del membrane z molekularnim označevalcem in proteinskim profilom hondrocitov pobarvali z barvilom Coomassie Brilliant Blue, da smo lahko ocenili uspešnost prenosa proteinov na membrano. Membrane s proteini hondrocitov smo inkubirali v vseh serumih in sinovialnih tekočinah, ki smo jih uporabili v poskusih z vzorci hrustančnih tkiv.

Prenos proteinov hrustančnih celic je bil uspešen, prenesli smo proteine molekulskih mas 10-95 kDa (slika 7, stezi 1 in 2). V serumih neokuženih živali (S1, S12 in S13) in njihovih sinovialnih tekočinah (ST1, ST12 in ST13) so bila prisotna protitelesa, ki so reagirala s proteini hondrocitov (slika 7, steze 3, 4 in 5 za serume ter 8, 9 in 10 za sinovialne tekočine). Na splošno je bilo v serumih in sinovialnih tekočinah okuženih kokoši prisotnih veliko več pozitivnih reakcij kot pri hrustančnih tkivih. S serumom JAHO-1 smo dokazali pozitivno reakcijo s proteinom molekulske mase okoli 28 kDa. Za serum št. 4 smo dokazali pozitivne reakcije s proteini molekulskih mas okoli 34, 40 in 43 kDa (slika 7, stezi 6 in 7). V sinovialnih tekočinah smo zasledili relativno veliko pozitivnih reakcij s proteini hondrocitov (slika 7, steze 11, 12 in 13), pri sinovialni tekočini JAHO-1 pet proteinov z molekulskimi masami okoli 17, 28, 55, 60 in 90 kDa, pri sinovialni tekočini MS-1 reakcije s proteini z molekulsko maso okoli 28, 45, 55 in 60 kDa. Protitelesa sinovialne tekočine MS-3 so prepoznala največ proteinov. Njihove molekulske mase so bile okoli 15, 17, 20, 28, 40, 43, 45, 44, 60, 72 in 75 kDa.



Legenda:

Steza 1: Molekularni označevalec (Fermentas, Page Ruler™ Prestained Protein Ladder).

Steza 2: Proteini hrustančnega tkiva, pobarvani z barvilom Coomassie Blue.

Steza 3: Membrana s proteini hondrocitov, inkubirana v serumu S1.

Steza 4: Membrana s proteini hondrocitov, inkubirana v serumu S12.

Steza 5: Membrana s proteini hondrocitov, inkubirana v serumu S13.

Steza 6: Membrana s proteini hondrocitov, inkubirana v serumu JAHO-1.

Steza 7: Membrana s proteini hondrocitov, inkubirana v serumu št. 4.

Steza 8: Membrana s proteini hondrocitov, inkubirana v sinovialni tekočini ST1.

Steza 9: Membrana s proteini hondrocitov, inkubirana v sinovialni tekočini ST12.

Steza 10: Membrana s proteini hondrocitov, inkubirana v sinovialni tekočini ST13.

Steza 11: Membrana s proteini hondrocitov, inkubirana v sinovialni tekočini JAHO-1.

Steza 12: Membrana s proteini hondrocitov, inkubirana v sinovialni tekočini MS-1.

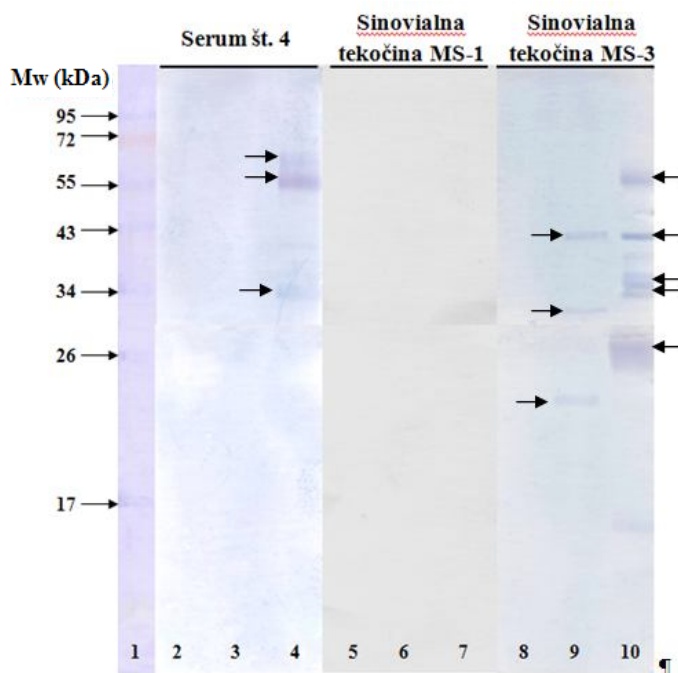
Steza 13: Membrana s proteini hondrocitov, inkubirana v sinovialni tekočini MS-3.

Slika 7: Reakcije proteinov iz razgrajenih kokošjih hondrocitov s protitelesi, ki so prisotna v serumih ali sinovialnih tekočinah kokoši, ki so bile naravno ali eksperimentalno okužene z *Mycoplasma synoviae*. Serumi in sinovialne tekočine neokuženih kokoši so uporabljeni kot primerjalna kontrola. Na drugi stopnji testa so bila uporabljena kunčja protitelesa proti kokošjim IgG, konjugirana s peroksidazo in nato dodan substrat TrueBlue.

4.3 PROTITELESA PROTI KOKOŠJEMU KOLAGENU

Poleg proteinov iz hrustančnega tkiva in hondrocitov, smo v serumih in sinovialnih tekočinah okuženih živali inkubirali še vzorce kokošjega kolagena. Kolagen (kokošji, tip II) smo na SDS-PAGE gel nanegli v treh oblikah: nerazgrajeni, razgrajen z encimom kolagenaza II in z encimom hialuronidaza. Podobno kot pri tkivih in hondrocitih smo proteine iz gela prenesli na membrano PVDF, membrano inkubirali v vzorcih serumov oz. sinovialnih tekočin in nato še v označenih sekundarnih protitelesih. Vzorce kolagena smo inkubirali le v serumu št. 4 ter sinovialnih tekočinah MS-1 in MS-3 (vsi iz okuženih kokoši), saj je bilo v teh vzorcih največ protiteles proti proteinom hrustančnih tkiv in hondrocitov. Rezultati so prikazani na sliki 8.

Zanimalo nas je, ali so v serumih oz. sinovialnih tekočinah prisotna protitelesa, ki se vežejo na kolagen (v nerazgrajeni ali encimsko razgrajeni obliki). Noben od testiranih vzorcev (serum št. 4 ter sinovialni tekočini MS-1 in MS-3) ni reagiral z nerazgrajenim kolagenom (slika 8, steze 2, 5 in 8). Serum št. 4 je pozitivno reagiral s kolagenom, razgrajenim s hialuronidazo (molekulska masa proteinov okoli 34, 55 in 60 kDa, slika 8, steza 4). Pri inkubaciji kolagena v sinovialni tekočini MS-1 nismo opazili nobenih reakcij. V sinovialni tekočini verjetno ni bilo protiteles, ki bi prepoznavala kakršnekoli epitope na kolagenu. Nasprotno pa smo dokazali dobro reaktivnost vzorca sinovialne tekočine MS-3 s kolagenom, tako po razgradnji kolagena s kolagenazo II kot tudi po razgradnji s hialuronidazo. Na sliki 8 lahko na stezi 9 vidimo tri reakcije s proteini z molekulsko maso okoli 20, 30 in 40 kDa, na stezi 10 pa reakcije petih proteinov (molekulske mase proteinov okoli 26, 34, 36, 43 in 55 kDa).



Legenda:

Steza 1: Molekularni označevalec (Fermentas, Page Ruler™ Prestained Protein Ladder).

Steza 2: Kolagen brez encimske razgradnje, inkubiran v serumu št. 4.

Steza 3: Kolagen, razgrajen s kolagenazo, inkubiran v serumu št. 4.

Steza 4: Kolagen, razgrajen s hialuronidazo, inkubiran v serumu št. 4.

Steza 5: Kolagen brez encimske razgradnje, inkubiran v sinovialni tekočini MS-1.

Steza 6: Kolagen, razgrajen s kolagenazo, inkubiran v sinovialni tekočini MS-1.

Steza 7: Kolagen, razgrajen s hialuronidazo, inkubiran v sinovialni tekočini MS-1.

Steza 8: Kolagen brez encimske razgradnje, inkubiran v sinovialni tekočini MS-3.

Steza 9: Kolagen, razgrajen s kolagenazo, inkubiran v sinovialni tekočini MS-3.

Steza 10: Kolagen, razgrajen s hialuronidazo, inkubiran v sinovialni tekočini MS-3.

Slika 8: Reakcije nerazgrajenega in encimsko razgrajenega kolagena s protitelesi piščančjega seruma št. 4 in sinovialnih tekočin MS-1 in MS-3, ki izvirajo iz z *Mycoplasma synoviae* okuženih piščancev. Na drugi stopnji testa so bila uporabljena kunčja protitelesa proti kokošjim IgG, konjugirana s peroksidazo in nato dodan substrat TrueBlue.

4.4 PROTEINI, KI REAGIRAJO Z AVTOPROTITELESI

Proteine iz hrustančnega tkiva in hondrocitov, ki so reagirali s protitelesi v serumih ali sinovialnih tekočinah, smo uredili v skupno preglednico (Preglednica 5), da bi ugotovili, ali so določene reakcije značilne samo za hrustančno tkivo ali hondrocite in ali obstajajo morda določene reakcije med protitelesi in proteini, ki bi bile skupne ne glede na izvor proteina.

Preglednica 5: Prikaz proteinov po ocenjenih molekulskih masah, ki so reagirali z (avto) protitelesi v serumu št. 4 ter sinovialnih tekočinah MS-1 in MS-3 iz okuženih kokoši.

		Serum št. 4					Sinovialna tekočina MS-1					Sinovialna tekočina MS-3				
		T1	T12	T13	CCH	Kol	T1	T12	T13	CCH	Kol	T1	T12	T13	CCH	Kol
Ocenjene molekulske mase (kDa) proteinov, kjer smo opazili reakcije	15						X					X			X	
	17						X					X			X	
	19												X			
	20							X			X				X	
	26											X		X		X
	28	X								X			X		X	
	30			X			X		X		X	X		X		
	34				X	X										X
	36							X					X			X
	40				X						X				X	
	43				X		X					X			X	X
	45									X					X	
	50											X				
	55					X				X					X	X
	60			X		X				X					X	
72														X		
75														X		

Legenda:

T1 – vzorec hrustančnega tkiva T1

T12 – vzorec hrustančnega tkiva T12

T13 – vzorec hrustančnega tkiva T13

CCH – hondrociti

KOL – kolagen, razgrajen s kolagenazo ali hialuronidazo

Z našimi analizami smo želeli izpostaviti proteine, ki so reagirali s protitelesi v posameznih vzorcih ter ugotoviti, ali so protitelesa, ki reagirajo z določenimi proteini, prisotna v serumih in sinovialnih tekočinah različnih živali. Kot je razvidno iz preglednice 5, obstajajo določeni proteini v hrustančnem tkivu, hondrocitih in pri vzorcih razgrajenega kolagena, ki so reagirali s protitelesi v različnih serumih in sinovialnih tekočinah. V preglednici 5 so prikazani samo rezultati reakcij s serumom št. 4 ter s sinovialnima tekočinama MS-1 in MS-3, v katerih so protitelesa proti največ proteinom od vseh testiranih vzorcev. Ugotovili smo, da obstajajo določeni proteini (identificirani le preko ocenjene molekulske mase), ki so se pojavljali v različnih bioloških vzorcih in so reagirali s protitelesi iz več testiranih vzorcev.

Zanimalo nas je, kateri proteini iz hrustančnih tkiv in hondrocitov so možni avtoantigeni ter ali se ti proteini pojavljajo v obeh bioloških vzorcih. Proteine smo določali samo s pomočjo ocenjene molekulske mase (glej točke 4.1 – 4.3). V hrustančnem tkivu T1 smo dokazali reakcije protiteles iz serumov ali sinovialnih tekočin s sedmimi proteini, pri tkivu T12 s štirimi proteini in pri tkivu T13 s tremi proteini. Pri hondrocitih je prišlo do reakcije protiteles z dvanajstimi proteini. Zanimivo je, da se veliko število proteinov pojavlja v reakcijah s protitelesi tako pri tkivih kot tudi pri hondrocitih (proteini z ocenjeno molekulsko maso 15, 17, 20, 28, 43 in 60 kDa).

V sinovialnih tekočinah MS-1 in MS-3 ter v serumu št. 4 so prisotna lokalna avtoprotitelesa, ki se vežejo na epitope hrustančnih tkiv in hondrocitov. Iz preglednice 4 je mogoče razbrati tudi, da so avtoprotitelesa iz seruma in sinovialnih tekočin prepoznavala proteine z enako molekulsko maso. Ta avtoprotitelesa so verjetno posledica razvoja sistemskega odziva na okužbo z *M. synoviae*, gre torej za sistemska avtoprotitelesa. Proteinov, ki so reagirali s protitelesi v serumih in sinovialnih tekočinah, je sedem (ocenjene molekulske mase 28, 30, 34, 40, 43, 55 in 60 kDa).

Nenazadnje nas je zanimalo tudi, ali ugotovitve iz naše raziskave sovpadajo z znanimi podatki iz strokovne literature. V preglednici 5 so predstavljeni proteini, ki so reagirali z avtoprotitelesi v naših poskusih (podani z ocenjeno molekulsko maso), in proteini, ki se v

literaturi pojavljajo kot znani avtoantigeni pri humanem revmatoidnem artritisu in imajo približno enako molekulsko maso kot proteini iz naše raziskave.

Preglednica 6: Pregled najbolj pogostih proteinov, ki se pojavljajo kot glavni kandidatni avtoantigeni pri artritisu.

Protein iz naše raziskave (kDa)	Protein iz literature (kDa)	Referenca
40	filagrin (40 kDa)	Simon in sodelavci (1993)
50	alfa enolaza (48 kDa)	Terrier in sodelavci (2007)
50/55/60	vimentin (50-60 kDa)	Steendam in sodelavci (2010)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Okužba kokoši s patogeno mikoplazmo *Mycoplasma synoviae* povzroča kužni (infekciозni) sinovitis, ki se kaže kot vnetje sklepov in sklepnih ovojníc (Kerr in Olson, 1970). Nekatere raziskave kažejo na avtoimunsko naravo obolenja (Jordan, 1985). Ugotavljali smo, ali so v sinovialnih tekočinah in serumih kokoši, ki so bile okužene z *M. synoviae*, prisotna protitelesa, ki reagirajo s proteini kokošjega hrustančnega tkiva, hondrocitov in kokošjega kolagena tipa II. Preverili smo tudi, ali se molekulske mase proteinov, ki so reagirali s protitelesi v naših vzorcih, ujemajo z znanimi avtoantigeni za revmatoidni artritis pri človeku, ki so opisani v literaturi.

Na splošno so serumi in sinovialne tekočine iz kokoši, ki niso bile okužene z *M. synoviae* (serumi S1, S12 in S13 ter sinovialne tekočine ST1, ST12 in ST13), pokazali drugačne reakcijske vzorce kot vzorci okuženih kokoši, kar je bilo tudi pričakovano, saj neokužene kokoši niso imele stika s patogeno bakterijo *M. synoviae*. Bilo je nekaj izjem, kjer so se pojavile »nespecifične« reakcije, ki smo jih pri interpretaciji rezultatov upoštevali kot ozadje. Te »nespecifične« reakcije so najverjetneje navzkrižne reakcije proteinov tkiva ali celic z drugimi protitelesi zaradi podobnost epitopov. Pri tem je treba omeniti, da imajo tudi kokoši t.i. naravna protitelesa, ki reagirajo z zelo različnimi antigeni, tudi takimi, katerim niso bile nikoli izpostavljene (npr. kunčji eritrociti). Obstajajo tudi naravna avtoprotitelesa, vendar za kokoši ni podatka o tem, da imajo lahko v serumu avtoprotitelesa, ki reagirajo s proteini hrustanca ali hondrocitov (Parmentier in sod., 2004). Več »nespecifičnih« reakcij je bilo opaženih po inkubaciji vzorcev s serumi, kar je verjetno posledica večjega repertoarja prisotnih protiteles v serumu v primerjavi s sinovialnimi tekočinami.

V serumih in sinovialnih tekočinah kokoši, ki so bile okužene z *M. synoviae*, so bila prisotna protitelesa, ki so prepoznavala proteine hrustančnega tkiva in hondrocitov. Na splošno je bilo pri inkubacijah s sinovialnimi tekočinami (med katerimi gre izpostaviti MS-

1 in MS-3) dokazanih več pozitivnih reakcij kot v serumih. Te rezultate gre pripisati dejstvu, da naravna in eksperimentalna okužba z *M. synoviae* pri kokoših lahko napreduje do obolenja sklepov. Inokulacija *M. synoviae* (F10-2AS) v sklep je inducirala močan lokalni imunski odziv v sklepu, kjer se nahaja sinovialna tekočina in verjetno tudi povzročila nastanek lokalnih avtoprotiteles, ki so reagirala s proteini hrustanca (avtoantigeni).

V naši raziskavi smo določili skupno 18 različnih proteinov velikosti od 15 do 75 kDa (ocenjena molekulska masa), na katere so se vezala avtoprotitelesa tipa IgG. V hrustančnem tkivu T1 smo zasledili sedem, v tkivu T12 štiri in v tkivu T13 tri proteine, ki so reagirali z IgG avtoprotitelesi iz sinovialnih tekočin in serumov okuženih živali. V vzorcu razgrajenih hrustančnih celic smo zasledili 12 proteinov, ki so reagirali z avtoprotitelesi v enakih vzorcih. Serumi »neokuženih« kokoši so morda vsebovali tudi naravna avtoprotitelesa, ki so se vezala na proteine hrustanca oz. hondrocitov. Vezanje je bilo relativno »močno«, saj spiranje trakov s pufrom, ki je vseboval 0,05 % Tween 20 ni odstranilo vezanih avtoprotiteles. Na drugi strani pa je mogoče, da so avtoprotitelesa v serumih »neokuženih« kokoši nastala ob okužbi s kakšno drugo bakterijo ali virusom. Vsekakor bi bile potrebne nadaljnje raziskave o prisotnosti naravnih avtoprotiteles (pri kokoših) proti proteinom hrustanca in hondrocitov.

Razlike med sinovialnimi tekočinami (tudi med MS-1 in MS-3) so verjetno posledica dejstva, da le-te izhajajo iz različnih živali. Razvoj imunskega repertoarja je specifičen za posameznika, zato nastajajo razlike v imunskih reakcijah (npr. v reaktivnosti s proteini hrustanca in hrustančnih celic). Analize, opravljene izven te naloge, so pokazale, da so v sinovialnih tekočinah MS-1 in MS-3 prisotne primerljive količine avtoprotiteles proti enolazi, Fc delu kokošjih IgG in fibronektinu. Tudi seruma istih dveh piščancev (nista uporabljena v tej nalogi) sta imela taka avtoprotitelesa in tudi protitelesa proti kolagenu in proteinom hondrocitov (D. Benčina – osebne informacije). Razlike v reaktivnosti med serumom in sinovialnimi tekočinami pa izhajajo iz razlik v generiranju protitelesne variabilnosti pri pticah.

V literaturi je opisanih več proteinov, za katere menijo, da so avtoantigeni pri človeškem revmatoidnem artritisu. Ti proteini se največkrat uporabljajo kot diagnostični markerji v klinični praksi in imajo prognostično vrednost. Želeli smo primerjati, ali kakšen od opisanih avtoantigenov ustreza proteinom, pri katerih smo določili reakcijo v naši raziskavi. Znani avtoantigeni pri revmatoidnem artritisu so poleg Fc dela IgG komponente hrustanca (kolagen tip II v nativni ali denaturirani obliki), proteini toplotnega stresa (humani Hsp60, BiP), encimi (α -enolaza, glukoza-6-fosfat izomeraza), jedrni proteini (RA33/hnRNP A2) ali citrulinirani proteini (filagrin, fibrin, fibrinogen, vimentin, kolagen) (Song in Kang, 2010; Cope in Sønderstrup, 1998).

V naši raziskavi sta sinovialni tekočini MS-1 in MS-3 očitno vsebovali IgG avtoprotitelesa za kokošji kolagen tipa II. Veliko boljše so bile reakcije z razgrajenim kolagenom (slika 8, stezi 9 in 10). Glede na čas okužbe (12 dni po inokulaciji *M. synoviae* v sklep), so se avtoprotitelesa pojavila zgodaj. Ali je *M. synoviae*, ki je kolonizirala sklepne ovojnice, razgrajevala kolagen, ni znano. V obeh sinovialnih tekočinah (MS-1 in MS-3) je bila ugotovljena cepitev IgG na Fab in Fc (glej tudi Cizelj in sod., 2011), ki kaže na proteolitično delovanje CysP *M. synoviae* (D. Benčina, osebne informacije). To delovanje in možna desializacija Fc dela IgG z neuraminidazo NanH *M. synoviae* je verjetno prispevalo k temu, da je bil v MS-1 in MS-3 prisoten tudi revmatoidni faktor (avtoprotitelesa proti Fc delu IgG).

Encim enolaza, posebno njena citrulinirana oblika, je dobro znan avtoantigen tudi pri RA. Enolaza *M. synoviae* je imunogena za okužene kokoši in zaradi strukturne podobnosti s kokošjo α -enolazo zelo verjetno avtoantigen (Berčič in sod., 2008a). Analize, ki niso bile del te raziskave, so pokazale, da so tudi v sinovialnih tekočinah MS-1 in MS-3 protitelesa, ki se vežejo na kunčjo enolazo (ta je zelo podobna kokošji enolazi, ki ima molekulsko maso okoli 50-55 kDa). Zelo verjetno je, da je bil v proteinskem profilu hondrocitov protein z molsko maso 55 kDa (α)enolaza (slika 7, steza 2). Če je bilo tako, so avtoprotitelesa vzorcev MS-1 in MS-3 reagirala tudi z enolazo hondrocitov (slika 7, steze 11-13). Znano je, da je modificirana enolaza (spremembra arginina v citrulinsko kislino) izrazit avtoantigen (Terrier in sod., 2007). *M. synoviae* ima gen za arginin deiminazo,

vendar ni znano ali ga izraža in zato tudi ne, če lahko modificira lastne ali gostiteljeve proteine, npr. enolazo.

Leta 1993 so Simon in sodelavci prvič opisali protein filagrin (okoli 40 kDa velik protein) kot možni avtoantigen pri revmatoidnem artritisu. Tudi pri naših raziskavah smo opazili protein z molekulsko maso 40 kDa, ki je reagiral z avtoprotitelesi (sinovialne tekočine in serum) pri hondrocitih. Steendam in sodelavci (2010) so opisali citrulinirani vimentin kot možni avtoantigen pri pacientih z revmatoidnim artritisom. Njegova molekulska masa je bila ocenjena na 50-60 kDa. V našem poskusu smo pri hondrocitih zaznali tri proteine (molekulske mase: 50, 55 in 60 kDa), ki so reagirali z avtoprotitelesi (preglednica 5) in bi kateri od njih lahko predstavljali molekulo vimentina.

Opisane reakcije protiteles iz serumov in sinovialnih tekočin s kolagenom ter proteini lastnega sklepnega hrustanca in hondrocitov potrjujejo domnevo, da ima tudi kužni (infekciозni) sinovitis avtoimunsko naravo. Nadaljnje delo, ki bi logično sledilo našim raziskavam, je identifikacija proteinov, ki so reagirali s protitelesi z uporabo 2D elektroforeze, masne spektrometrije ali kakšne druge proteomske metode. Če predpostavimo, da bi bila kokoš ustrezen eksperimentalni model za preučevanje revmatoidnega artritisa pri ljudeh, bi lahko tudi na človeških vzorcih ugotavljali reakcije in pomen omenjenih proteinov.

5.2 SKLEPI

- V sinovialnih tekočinah in serumih, ki izvirajo iz kokoši, okuženih z *M. synoviae*, so prisotna IgG protitelesa, ki prepoznavajo antigene hrustančnega tkiva, hondrocitov in/ali kokošjega kolagena tipa II.
- Določeni avtoantigeni se pojavljajo tako pri hrustančnem tkivu kot tudi pri hondrocitih.
- Avtoprotitelesa, ki se vežejo na avtoantigene iz hrustančnega tkiva ali hondrocitih so lahko lokalna ali sistemska. Lokalna avtoprotitelesa so tista, ki so bila prisotna

samo v sinovialnih tekočinah kokoši, okuženih z *M. synoviae*. Sistemska avtoprotitelesa so prisotna tudi ali samo v serumih okuženih živali.

- V serumih kokoši, ki niso bile okužene z *M. synoviae*, so bila prisotna IgG protitelesa, ki so se vezala na nekatere proteine hrustanca in hondrocitov. To bi bila lahko naravna protitelesa oz. naravna avtoprotitelesa.
- V literaturi se pojavljajo kandidatni avtoantigeni (pri avtoimunskih obolenjih), katerih molekulska masa se ujema z ocenjeno molekulsko maso nekaterih proteinov, ki smo jih dokazali v naši raziskavi (vimentin, filagrin). Poleg kolagena (tipa II) je zelo verjeten avtoantigen tudi enolaza. Ta ima podobno primarno strukturo kot enolaza *M. synoviae*, ki je imunogena za okužene kokoši.

6 POVZETEK

Mycoplasma synoviae je patogena bakterija iz razreda *Mollicutes*, ki pri kokoših in puranih povzroča kužni sinovitis. Kužni sinovitis med drugim spremljajo tudi avtoimunski pojavi (npr. nastanek avtoprotiteles proti eritrocitom gostitelja in proti Fc delu IgG).

Namen diplomske naloge je bil preučiti ali kokoši s kužnim sinovitisom (naravna in eksperimentalna okužba z *M. synoviae*) proizvajajo avtoprotitelesa proti hrustančnemu tkivu, hondroцитom in kolagenu tipa II. Kot primerjalno kontrolo smo uporabili serume in sinovialne tekočine kokoši, ki niso bile okužene z *M. synoviae*. Z SDS elektroforezo, prenosom proteinov na membrano in z uporabo označenih protiteles proti kokošjim IgG, smo ugotavljali ali so se kakšna protitelesa vezala na proteine tkiva in celic.

Vzorci serumov in sinovialnih tekočin kokoši oz. piščancev, ki so bili okuženi z *M. synoviae* (zlasti sinovialne tekočine eksperimentalno okuženih piščancev), so prepoznavali več proteinov hrustančnega tkiva in hondroцитov kot vzorci kokoši, ki niso bile okužene z *M. synoviae*. Neokuženi serumi so vsebovali (avto)protitelesa, ki so reagirala z nekaterimi proteini hrustančnih tkiv in hondroцитov. Sklepamo, da so to naravna protitelesa, ki so prisotna tudi v serumih zdravih kokoši.

Pri poskusih s sinovialnimi tekočinami okuženih živali z akutnim sinovitisom (vzorci odvzeti 12 dni po inokulaciji z *M. synoviae*), so bila v sinovialnih tekočinah prisotna IgG protitelesa, ki so reagirala s kolagenom, še posebej če je bil ta razgrajen s kolagenazo II ali hialuronidazo. V istih vzorcih so bila prisotna protitelesa IgG razreda, ki so reagirali s proteini kokošjih hondroцитov ali hrustančnega tkiva, zlasti s proteini molekulskih mas okoli 40, 50, 55 in 60 kDa. Protein velikosti okoli 55 kDa bi bil lahko enolaza, ki je eden glavnih avtoantigenov, zlasti, če pride pri gostitelju do okužbe z bakterijami. To je zelo verjetna razlaga tudi za primere okužbe kokoši z *M. synoviae*, katere enolaza je visoko imunogena in tudi strukturno zelo podobna enolazi gostitelja.

Raziskava v okviru te diplomske naloge prispeva nove informacije o avtoprotitelesih pri kokoših, zlasti v primeru pojava kužnega sinovitisa in artritisa, ki ga povzroča okužba z *M. synoviae*. Nadaljnje raziskave bi zajemale natančno identifikacijo proteinov, ki so bili v tej nalogi definirani le preko ocenjene molekulske mase. To bi dosegli z uporabo metod proteomike in bioinformatike.

7 VIRI

- Abbas A.K., Lichtman A.H. 2001. Basic immunology: Functions and disorders of the immune system. 2nd ed. Philadelphia, Elsevier Saunders: 323 str.
- Aldridge K.E.1975. Growth and cytopathology of *Mycoplasma synoviae* in chicken embryo cell cultures. *Infection and Immunity*, 12, 1: 198-204
- Benčina D. 2002. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Pathology*, 31: 535-547
- Berčič R.L., Cizelj I., Dušanić D., Narat M., Zorman-Rojs O., Dovč P., Benčina D. 2011. Neuraminidase of *Mycoplasma synoviae* desialylates heavy chain of the chicken immunoglobulin G and glycoproteins of chicken tracheal mucus. *Avian Pathology*, 40, 3: 299-308
- Berčič R.L., Slavec B., Lavrič M., Narat M., Bidovec A., Dovč P., Benčina D. 2008a. Identification of major immunogenic proteins of *Mycoplasma synoviae* isolates. *Veterinary Microbiology*, 127: 147-154
- Berčič R.L., Slavec B., Lavrič M., Narat M., Zorman-Rojs O., Dovč P., Benčina D. 2008b. A survey of avian *Mycoplasma* species for neuraminidase enzymatic activity. *Veterinary Microbiology*, 130: 391-397
- Bhosale A.M., Richardson J.B. 2008. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin*, 87: 77-97
- Bradbury J.M. 1998. Recovery of *Mycoplasmas* from birds. V: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 104: *Mycoplasma* protocols. Miles R.J., Nicholas R.A.J. (eds.). Totowa, New Jersey, Humana Press Inc.: 45-51

- Cizelj I., Berčič R.L., Dušanić D., Narat M., Kos J., Dovč P., Benčina D. 2011. *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* express a cysteine protease CysP, which can cleave chicken IgG into Fab and Fc. *Microbiology*, 157: 362-372
- Cope A.P., Sønderstrup G. 1998. Evaluating candidate autoantigens in rheumatoid arthritis. *Springer Seminars in Immunopathology*, 20: 23-39
- Dušanić D., Berčič R.L., Cizelj I., Salmič S., Narat M., Benčina D. 2009. *Mycoplasma synoviae* invades non-phagocytic chicken cells in vitro. *Veterinary Microbiology*, 138: 114-119
- Harlow E., Lane D. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*. 1st. ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory: 726 str.
- Jordan F.T.W. 1985. Gordon memorial lecture – People, poultry and pathogenic mycoplasmas. *British Poultry Science*, 26: 1-15
- Jordan F.T.W., Ernø H., Cottew G.S., Hinz K.H., Stipkovits L. 1982. Characterization and taxonomic description of five *Mycoplasma* serovars (serotypes) of avian origin and their elevation to species rank and further evaluation of the taxonomic status of *Mycoplasma synoviae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32, 1: 108-115
- Kawakubo Y., Kume K., Yoshioka M. 1980. Histo- and immuno-pathological studies on experimental *Mycoplasma synoviae* infection of the chicken. *Journal of Comparative Pathology*, 90: 457-467
- Kerr K.M., Olson N.O. 1970. Pathology of chickens inoculated experimentally or contact-infected with *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 14, 2: 290-320
- Kleven S.H. 2003. *Mycoplasmosis. V: Diseases of Poultry*. Saif Y.M. (ed.). Ames, Iowa, Blackwell Pub.: 719-762

- Lavrič M., Benčina D., Kothlow S., Kaspers B., Narat M. 2007. Mycoplasma synoviae lipoprotein MSPB, the N-terminal part of VlhA haemagglutinin, induces secretion of nitric oxide, IL-6 and IL-1 β in chicken macrophages. *Veterinary Microbiology*, 121: 278-287
- Lavrič M., Maughan M.N., Bliss T.W., Dohms J.E., Benčina D., Keeler Jr. C.L., Narat M. 2008. Gene expression modulation in chicken macrophages exposed to Mycoplasma synoviae or Escherichia coli. *Veterinary Microbiology*, 126: 111-121
- Lockaby S.B., Hoerr F.J. 1999. Virulence of Mycoplasma synoviae in poultry: a review. *World's Poultry Science Journal*, 55: 175-185
- Lockaby S.B., Hoerr F.J., Lauerman L.H., Kleven S.H. 1998. Pathogenicity of Mycoplasma synoviae in broiler chickens. *Veterinary Pathology*, 35: 178-190
- Martinčič Štiblar D. 2005. Hrustančevina. V: Histologija: učbenik. Petrovič D., Zorc M. (ur.) Ljubljana, Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta: 27-33
- May M., Kleven S.H., Brown D.R. 2007. Sialidase activity in Mycoplasma synoviae. *Avian Diseases*, 51, 4: 829-833
- McLelland J. 1990. A Colour Atlas of Avian Anatomy. London, Wolfe Publishing Ltd.: 127 str.
- Morrow C.J., Bell I.G., Walker S.B., Markham P.F., Thorp B.H., Whithear K.G. 1990. Isolation of Mycoplasma synoviae from infectious synovitis of chickens. *Australian Veterinary Journal*, 67, 4: 121-124
- Narat M., Benčina D., Kleven S.H., Habe F. 1998. The hemagglutination-positive phenotype of Mycoplasma synoviae induces experimental infectious synovitis in

chickens more frequently than does the hemagglutination-negative phenotype. *Infection and Immunity*, 66, 12: 6004-6009

Noormohammadi A.H., Markham P.F., Kanci A., Whithear K.G., Browning G.F. 2000. A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. *Molecular Microbiology*, 35, 4: 911-923

Parmentier H.K., Lammers A., Hoekman J.J., De Vries Reilingh G., Zaanen I.T.A., Savelkoul H.F.J. 2004. Different levels of natural antibodies divergently selected for specific antibody responses. *Developmental and Comparative Immunology*, 28, 1: 39-49

Razin S., Herrmann R. 2002. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 572 str.

Razin S., Yogev D., Naot Y. 1998. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 4: 1094-1156

Seeley R.R., Stephens T.D., Tate P. 1995. *Anatomy & Physiology*. 3rd ed. St. Louis, Mosby: 1020 str.

Sells D.M. 1975. Progressive changes in serum proteins and the rheumatoid factor of chickens infected with *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 20, 1: 108-117

Simon M., Girbal E., Sebbag M., Gomés-Daudrix V., Vincent C., Salama G., Serre G. 1993. The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called »antikeratin antibodies«, autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *The Journal of Clinical Investigation*, 92, 3: 1387-1393

Song Y.W., Kang E.H. 2010. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies. *QJM*, 103, 3: 139-146

- Steendam K., Tilleman K., Ceuleneer M., Keyser F., Elewaut D., Deforce D. 2010. Citrullinated vimentin as an important antigen in immune complexes from synovial fluid of rheumatoid arthritis patients with antibodies against citrullinated protein. *Arthritis Research and Therapy*, 12: 132-142
- Terrier B., Degand N., Guilpain P., Servettaz A., Guillevin L., Mouthon L. 2007. Alpha-enolase: A target of antibodies in infectious and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 6: 176-182

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mojci Narat, ker mi je omogočila izdelavo diplomske naloge. Hvala za pomoč, motivacijo in številne koristne nasvete, ki so večkrat presegli okvire izdelave naloge in se jih bom spominjala tudi v nadaljnjem življenju!

Zahvaljujem se somentorici dr. Ireni Oven za hiter in strokoven pregled naloge ter vse nasvete v zvezi z izdelavo in pisanjem naloge!

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Vladki Čurin Šerbec za hiter in temeljit pregled naloge in predvsem za veliko mero pozitivne energije in prijaznosti!

Posebna zahvala gre Daliborki Dušanić za uvajanje v delo v celičnem laboratoriju. Hvala za veliko mero prilagodljivosti, strpnosti in za odlično družbo!

Zahvaljujem se znanstvenemu svetniku dr. Dušanu Benčini za nesebično pomoč in veliko koristnih nasvetov pri izdelavi naloge!

Hvala tudi vsem ostalim na Rodici, ki ste mi kakorkoli pomagali pri izdelavi diplomske naloge v laboratoriju!

Hvala staršem za finančno in predvsem moralno podporo v času študija, najboljša sta!

Hvala Tomažu, ker je vedno brezpogojno verjel vame in v moj uspeh!

Hvala Maši za odlično družbo skozi celotna študijska leta, bilo je nepozabno!

Hvala vsem, ki ste mi pomagali odrasti! Brez vas mi ne bi uspelo!