

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Luka BOLHA

**PREVERJANJE NUKLEAZNE AKTIVNOSTI PRI
PATOGENIH BAKTERIJAH IZBRANIH VRST RODU
*Mycoplasma***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Luka BOLHA

**PREVERJANJE NUKLEAZNE AKTIVNOSTI PRI PATOGENIH
BAKTERIJAH IZBRANIH VRST RODU *Mycoplasma***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANALYSIS OF NUCLEASE ACTIVITY IN SELECTED
PATHOGENIC BACTERIA OF THE GENUS *Mycoplasma***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

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

Študijska komisija univerzitetnega študija biotehnologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Mojco Narat, za somentorico dr. Ireno Oven in za recenzenta dr. Dušana Benčino.

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: asist. dr. Irena OVEN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: znan. svet. dr. Dušan BENČINA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 30. avgust 2010

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Luka BOLHA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

| | |
|----|--|
| ŠD | Dn |
| DK | UDK 606:591.2:577.151 (043.2) |
| KG | <i>Mollicutes/Mycoplasma/Mycoplasma synoviae/Mycoplasma canis/Mycoplasma cynos/Mycoplasma agalactiae/encimi/nukleaze/nukleazna aktivnost</i> |
| AV | BOLHA, Luka |
| SA | NARAT, Mojca (mentorica)/OVEN, Irena (somentorica) |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101 |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije |
| LI | 2010 |
| IN | PREVERJANJE NUKLEAZNE AKTIVNOSTI PRI PATOGENIH BAKTERIJAH IZBRANIH VRST RODU <i>Mycoplasma</i> |
| TD | Diplomsko delo (univerzitetni študij) |
| OP | XI, 81, [2] str., 8 pregl., 8 sl., 1 pril., 140 vir. |
| IJ | sl |
| JI | sl/an |
| AI | Nukleaze so skupina encimov, ki cepijo nukleinske kisline (NK) s hidrolizo fosfodieterskih vezi. Nukleazna aktivnost (NA) je bila opažena pri več vrstah rodu <i>Mycoplasma</i> in naj bi služila kot mehanizem za pridobivanje prekurzorjev za sintezo NK. NA smo preverjali na DNA, izolirani iz celic CEC-32, pri patogenih bakterijah <i>M. synoviae</i> (MS), <i>M. canis</i> (MCA), <i>M. cynos</i> (MCy) in <i>M. agalactiae</i> (MA). Mikoplazme in DNA smo skupaj inkubirali ter analizirali DNA z elektroforezo v agaroznem gelu. Dokazali smo, da imajo vse testirane mikoplazme NA, in da je NA vezana tudi na njihove membrane. Ugotovili smo, da je razgradnja izolirane DNA naraščala s časom inkubacije z MS. NA MS, MCA in MCy je bila močnejša, če so bili prisotni Mg^{2+} in Ca^{2+} ioni, NA MA pa je prisotnost Ca^{2+} ionov znižala. Preverjali smo tudi, ali MS po vstopu v žive celice CEC-32 z NA vpliva na razgradnjo gostiteljeve nativne DNA. Zanimale so nas še morfološke spremembe ter viabilnost celic CEC-32 po okužbi z MS. Po okužbi z MS je bila opažena razgradnja genomske DNA celic CEC-32, vendar nismo dokazali, da so to razgradnjo povzročile samo mikoplazemske nukleaze. Po 24 urah inkubacije z MS smo opazili vakuolizacijo citoplazme v okuženih celicah CEC-32, viabilnost pa je po 24 urah padla na 55 % in po 48 urah na 39 %, nato pa se tekom inkubacije ni bistveno spreminjala. |

KEY WORDS DOCUMENTATION

| | |
|----|--|
| DN | Dn |
| DC | UDC 606:591.2:577.151 (043.2) |
| CX | <i>Mollicutes/Mycoplasma/Mycoplasma synoviae/Mycoplasma canis/Mycoplasma cynos/Mycoplasma agalactiae/enzymes/nucleases/nuclease activity</i> |
| AU | BOLHA, Luka |
| AA | NARAT, Mojca (supervisor)/OVEN, Irena (co-supervisor) |
| PP | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101 |
| PB | University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology |
| PY | 2010 |
| TI | ANALYSIS OF NUCLEASE ACTIVITY IN SELECTED PATHOGENIC BACTERIA OF THE GENUS <i>Mycoplasma</i> |
| DT | Graduation thesis (university studies) |
| NO | XI, 81, [2] p., 8 tab., 8 fig., 1 ann., 140 ref. |
| LA | sl |
| AL | sl/en |
| AB | Nucleases are a group of enzymes that cleave nucleic acids by hydrolysing phosphodiester bonds. Nuclease activity (NA) has been reported in several <i>Mycoplasma</i> species and is believed to be the mechanism for these bacteria to acquire precursors for the synthesis of nucleic acids. We wanted to determine whether four pathogenic mycoplasmas, <i>M. synoviae</i> (MS), <i>M. canis</i> (MCa), <i>M. cynos</i> (MCy) and <i>M. agalactiae</i> (MA) had NA. The test was performed on dsDNA isolated from CEC-32 cells. By analyzing fragmented dsDNA on agarose gel electrophoresis, we proved that all four tested <i>Mycoplasma</i> species had NA and that NA was associated with their membranes. We showed that DNA fragmentation increased with the prolonged incubation with MS. NA of MS, MCa and MCy was stronger in the presence of Mg ²⁺ and Ca ²⁺ ions, but NA of MA appeared to be inhibited by Ca ²⁺ ions. We also wanted to determine whether the infection of live CEC-32 cells with MS resulted in fragmentation of the native DNA in host cells. In addition, we also analysed the morphologic changes and viability of CEC-32 cells after the infection with MS. Analysis of the agarose gel electrophoresis showed some degradation of native DNA, but we could not prove that this degradation was the result of NA in MS. 24 hours after the infection with MS, increased vacuolization was noticed in CEC-32 cells. Cell viability decreased to 55 % after 24 hours and to 39 % after 48 hours of infection and did not decrease after that. |

KAZALO VSEBINE

| | str. |
|---|-----------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA | III |
| KEY WORDS INFORMATION | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO SLIK | VIII |
| KAZALO PREGLEDNIC | IX |
| KAZALO PRILOG | X |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI | XI |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 NAMEN DELA | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 RAZRED <i>Mollicutes</i> | 3 |
| 2.1.1 Taksonomija in filogenija | 3 |
| 2.2 ROD <i>Mycoplasma</i> | 7 |
| 2.2.1 Ekologija in naravni habitati mikoplazem | 7 |
| 2.2.2 Genomi mikoplazem | 7 |
| 2.2.3 Metabolizem mikoplazem | 8 |
| 2.2.4 Membrana mikoplazem | 8 |
| 2.2.5 Giblјivost mikoplazem | 9 |
| 2.2.6 Patogeneza mikoplazem | 9 |
| 2.3 MIKOPLAZME PRI PTICAH | 11 |
| 2.3.1 <i>Mycoplasma synoviae</i> | 12 |
| 2.4 MIKOPLAZME PRI PSIH | 12 |
| 2.4.1 <i>Mycoplasma canis</i> | 13 |
| 2.4.2 <i>Mycoplasma cynos</i> | 14 |
| 2.5 MIKOPLAZME PRI MANJŠIH PREŽVEKOVALCIH | 14 |
| 2.5.1 <i>Mycoplasma agalactiae</i> | 15 |
| 2.6 NUKLEAZE | 15 |
| 2.6.1 Nukleaze pri mikoplazmah | 17 |
| 3 MATERIALI IN METODE | 20 |
| 3.1 CELIČNA LINIJA CEC-32 IN BAKTERIJSKE KULTURE | 20 |
| 3.1.1 Celična linija CEC-32 | 20 |
| 3.1.2 Izolacija DNA iz neokuženih celic CEC-32 | 20 |
| 3.1.3 Gojenje bakterijskih kultur | 21 |
| 3.1.4 Priprava membranskih frakcij mikoplazem | 21 |
| 3.1.5 Priprava vzorcev bakterijskih kultur in membranskih frakcij za testiranje nukleazne aktivnosti | 22 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.2 | PREVERJANJE NUKLEAZNE AKTIVNOSTI MIKOPLAZEM Z DNA IZ CELIC CEC-32 | 23 |
| 3.2.1 | Vpliv magnezijevih in kalcijevih ionov na nukleazno aktivnost | 23 |
| 3.2.2 | Preverjanje nukleazne aktivnosti <i>M. synoviae</i> | 24 |
| 3.2.3 | Preverjanje nukleazne aktivnosti <i>M. agalactiae</i>, <i>M. canis</i> in <i>M. cynos</i> | 25 |
| 3.2.4 | Priprava negativnih in pozitivnih kontrol za poskus nukleaznih aktivnosti | 25 |
| 3.2.5 | Agarozna gelska elektroforeza – analiza razgradnje DNA iz poskusov preverjanja nukleaznih aktivnosti | 26 |
| 3.2.5.1 | Priprava vzorcev za analizo razgradnje DNA iz poskusov preverjanja nukleaznih aktivnosti | 26 |
| 3.2.5.2 | Pogoji in potek elektroforeze za analizo razgradnje DNA iz poskusov preverjanja nukleaznih aktivnosti | 26 |
| 3.3 | PREVERJANJE NUKLEAZNE AKTIVNOSTI <i>M. synoviae</i> NA NATIVNI DNA V CELICAH CEC-32 <i>in situ</i> | 27 |
| 3.3.1 | Okužba celic CEC-32 | 27 |
| 3.3.2 | Izolacija DNA iz okuženih celic | 28 |
| 3.3.3 | Agarozna gelska elektroforeza – analiza DNA iz poskusov preverjanja nukleazne aktivnosti na nativni DNA <i>in situ</i> | 29 |
| 3.3.3.1 | Priprava vzorcev za analizo DNA iz poskusov preverjanja nukleazne aktivnosti na nativni DNA <i>in situ</i> | 29 |
| 3.3.3.2 | Pogoji in potek elektroforeze za analizo DNA iz poskusov preverjanja nukleazne aktivnosti na nativni DNA <i>in situ</i> | 29 |
| 3.3.4 | Preverjanje vpliva okužbe z <i>M. synoviae</i> na morfologijo celic CEC-32 | 30 |
| 3.3.5 | Določanje viabilnosti celic CEC-32 | 30 |
| 4 | RAZULTATI | 32 |
| 4.1 | PREVERJANJE NUKLEAZNE AKTIVNOSTI MIKOPLAZEM NA IZOLIRANI DNA | 32 |
| 4.1.1 | Nukleazna aktivnost <i>M. synoviae</i> | 32 |
| 4.1.1.1 | Vpliv Ca ²⁺ in Mg ²⁺ na nukleazno aktivnost <i>M. synoviae</i> in njenih membran | 34 |
| 4.1.2 | Nukleazna aktivnost <i>M. agalactiae</i>, <i>M. canis</i> in <i>M. cynos</i> | 34 |
| 4.1.2.1 | Vpliv Ca ²⁺ in Mg ²⁺ na nukleazno aktivnost <i>M. agalactiae</i> , <i>M. canis</i> in <i>M. cynos</i> | 36 |
| 4.2 | PREVERJANJE NUKLEAZNE AKTIVNOSTI <i>M. synoviae</i> NA NATIVNI DNA <i>in situ</i> | 36 |
| 4.2.1 | Vpliv <i>M. synoviae</i> na razgradnjo native DNA celic CEC-32 | 36 |
| 4.2.2 | Morfološke spremembe na celicah CEC-32 po okužbi z bakterijo <i>Mycoplasma synoviae</i> | 38 |
| 4.2.3 | Viabilnost celic CEC-32 po okužbi z <i>M. synoviae</i> | 39 |

| | | |
|----------|---------------------------|----|
| 5 | RAZPRAVA IN SKLEPI | 40 |
| 5.1 | RAZPRAVA | 40 |
| 5.2 | SKLEPI | 48 |
| 6 | POVZETEK | 49 |
| 7 | VIRI | 51 |
| | ZAHVALA | |
| | PRILOGA | |

KAZALO SLIK

| | str. |
|---|------|
| Slika 1: Princip delovanja endonukleaz in eksonukleaz. | 16 |
| Slika 2: Princip cepljenja fosfodiesterske vezi z nukleazami, na obeh straneh fosfata (Adams in sod., 1992: 98). | 16 |
| Slika 3: Analiza nukleazne aktivnosti <i>M. synoviae</i> (MS) in njenih membran (MS _{mem}) v pufru 1 (10 mM MgCl ₂) in pufru 2 (5 mM MgCl ₂ in 5 mM CaCl ₂) po inkubaciji od 30 min do 4 ur. Substrat je bila DNA izolirana iz celic CEC-32. DNA smo barvali z barvilom SYBR Safe (Invitrogen, S33102) in jo analizirali v 1,8 % agaroznem gelu. Gel smo slikali v UV-transiluminatorju (SYNGENE, U:Genius). Na sliki so označene dolžine fragmentov molekularnega označevalca (od 100 do 400 bp). | 33 |
| Slika 4: Analiza nukleazne aktivnosti <i>M. agalactiae</i> (MA), <i>M. canis</i> (MCa) in <i>M. cynos</i> (MCy) ter njihovih membran (MA _{mem} , MCa _{mem} in MCy _{mem}) v pufru 1 (10 mM MgCl ₂) in pufru 2 (5 mM MgCl ₂ in 5 mM CaCl ₂) po 2 urni inkubaciji. Substrat je bila DNA izolirana iz celic CEC-32. DNA smo barvali z barvilom SYBR Safe (Invitrogen, S33102) in jo analizirali v 1,8 % agaroznem gelu. Gel smo slikali v UV-transiluminatorju (SYNGENE, U:Genius). Na sliki so označene dolžine fragmentov molekularnega označevalca (od 100 do 400 bp). | 35 |
| Slika 5: Analiza razgradnje DNA v živih celicah CEC-32. DNA smo izolirali iz celic okuženih z <i>M. synoviae</i> (MS) ter iz celic pozitivne (5-FU) in negativne kontrole (NK) od 24 do 96 ur po okužbi oziroma začetku inkubacije. Genomsko DNA smo barvali z etidijevim bromidom (Sigma-Aldrich, Nemčija) in jo analizirali v 1,2 % agaroznem gelu. Gel smo slikali v UV-transiluminatorju (SYNGENE, U:Genius). | 37 |
| Slika 6: Neokužene celice CEC-32, slikane po 24 urni inkubaciji, pri 200× povečavi (negativna kontrola). | 38 |
| Slika 7: Celice CEC-32, slikane 24 ur po okužbi z <i>M. synoviae</i> , pri 200× povečavi. | 38 |
| Slika 8: Odvisnost preživetja celic CEC-32 od trajanja okužbe z <i>M. synoviae</i> ter pri pozitivni in negativni kontroli. | 39 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | str. |
|--|------|
| Preglednica 1: Filogenetske skupine, gruče in podgruče razreda <i>Mollicutes</i> (Johansson in Pettersson, 2002: 13). | 6 |
| Preglednica 2: Vrste in sevi mikoplazem, ki smo jih uporabili v eksperimentih. | 21 |
| Preglednica 3: Princip redčenja vzorcev mikoplazem in membran v pufri 1 in pufri 2. | 22 |
| Preglednica 4: Vzorci mikoplazem in membran, ki smo jih pripravili za poskuse razgradnje DNA celic CEC-32. | 23 |
| Preglednica 5: Kemikalije za pripravo pufra 1. | 24 |
| Preglednica 6: Kemikalije za pripravo pufra 2. | 24 |
| Preglednica 7: Prikaz poteka izolacij DNA iz celic CEC-32. | 28 |
| Preglednica 8: Celoten pregled opravljenih testov, ki smo jih opravili z posameznimi mikoplazemskimi vzorci. | 31 |

KAZALO PRILOG

Priloga A: Primerjava ohranjenosti aminokislin pri homolognih proteinskih zaporedjih za nukleaze tipa mhp379, pri različnih vrstah mikoplazem. Primerjavo zaporedij smo opravili s programom BLASTp, kjer smo proteinsko zaporedje nukleaze MAG_5040 bakterije *M. agalactiae* primerjali z zaporedji nukleaz ostalih mikoplazemskih vrst.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|---------------|---|
| BLASTp | algoritem za primerjanje bioloških sekvenc (<u>b</u> asic <u>l</u> ogical <u>a</u> lignment <u>s</u> earch <u>t</u> ool) |
| bp | bazni pari, enota za dolžino nukleinskih kislin |
| CEC-32 | celična linija piščančjih fibroblastov (<u>c</u> hicken <u>e</u> mbryo <u>c</u> ells) |
| CFU | število enot, ki tvorijo kolonije (<u>c</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nits) |
| DMEM | modificirano gojišče (<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium) |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| EDTA | kelator (2,2',2'',2'''-(etan-1,2-diildinitrilo)tetraacetna kislina) |
| EGTA | kelator (glikol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tatraacetna kislina) |
| FBS | fetalni goveji serum |
| 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 dolžino nukleinskih kislin (1000 bp) |
| kDa | kilodalton, enota za molekulsko maso |
| MiliQ | prečiščena in deionizirana voda |
| mM | milimol, enota za koncentracijo |
| NAD | nikotinamid adenin dinukleotid |
| PBS | fosfatni pufer (<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> olution) |
| RNA | ribonukleinska kislina |
| ROS | reaktivni kisikovi radikali (<u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies) |
| RPMI | gojišče za celične kulture (<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute medium) |
| SDS | natrijev dodecil sulfat |
| TBE | elektroforetski pufer (<u>T</u> ris/ <u>B</u> orate/ <u>E</u> DTA) |
| TE | pufer (<u>T</u> ris/ <u>E</u> DTA) |
| TNF- α | dejavnik tumorske nekroze- α |
| TRIS | pH pufer (2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol) |
| XTT | tetrazolijeva sol (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid) |
| 5-FU | 5-fluorouracil (5-fluoro-1H-pirimidin-2,4-dione) |

1 UVOD

Mikoplazme so skupina bakterij, ki jih uvrščamo v razred *Mollicutes* (Sirand-Pungnet, 2007a). So najmanjši znani organizmi, ki so zmožni samostojne rasti in podvojevanja. Njihova največja posebnost je majhen genom in odsotnost celične stene (Razin, 1978). Zaradi reduciranega genoma imajo skromne anabole sposobnosti in ne vsebujejo genov za biosintezo aminokislin, omejeno število genov je povezanih z biosintezo nukleotidov, kofaktorjev in vitaminov (Pollack, 2002). Mikoplazme imajo v membrani zelo velik delež lipoproteinov (Razin in sod., 1998).

Mikoplazme so v naravi razširjene kot paraziti ljudi, sesalcev, ptic, plazilcev, rib, členonožcev in rastlin. Naravni habitat živalskim in človeškim mikoplazmam predstavljajo sluznice respiratornega in urogenitalnega trakta, oči, prebavni trakt, mlečne žleze in sklepi. Mikoplazme so gostiteljsko in tkivno specifične (Razin in sod., 1998). Pomemben dejavnik pri patogenezi mikoplazem je pritrjevanje na gostiteljske celice (Rottem, 2003).

Mycoplasma synoviae je eden izmed glavnih patogenih mikroorganizmov kokoši in puranov ter povzroča veliko ekonomsko škodo pri intenzivni reji v perutninski industriji. Povzroča respiratorna obolenja in poškodbe sklepov. Okužba se med jatami ptic pogosto prenaša vertikalno preko okuženih jajc (Kleven, 1997). Faktorji patogenosti *M. synoviae* niso povsem pojasnjeni (Lockaby in sod., 1999), vključujejo pa sposobnost hemaglutinacije (Narat in sod., 1998) in nevraminidazne aktivnosti (Berčič in sod., 2008). Pri *M. synoviae* je bila dokazana zmožnost invadiranja nefagocitirajočih kokošjih celic v *in vitro* pogojih (Dušanić in sod., 2009).

Bakterijo *Mycoplasma canis* so izolirali iz psov z urogenitalnimi obolenji in neplodnostjo, ni pa znano ali je povzročitelj teh bolezni (L'Abée-Lund in sod., 2003). *M. canis* ni specifična le za enega gostitelja (Nicholas in sod., 1995). Našli so jo tudi pri zdravem in bolnem govedu (ter Laak in sod., 1993; Thomas in sod., 2002) ter pri človeku z respiratornim obolenjem (Armstrong in sod., 1971). *M. canis* je bila dokazana močna nevraminidazna aktivnost (May in Brown, 2009; Zakrajšek, 2008), povzroča lahko hemaglutinacijo oziroma hemadsorbcijo in ima spremenljivo proteolitično aktivnost (Gardella in DelGuidice, 1983).

Mycoplasma cynos je edina mikoplazma, ki je bila pogosto povezana z respiratornimi boleznimi pri psih (Rosendal, 1972; Rosendal in Vinther, 1977). Naseljuje mukozne membrane vek, zgornji respiratorni trakt, pljučna tkiva in genitalne organe psov in psic (Rosendal, 1973). Dokazano je bilo, da povzroča hemaglutinacijo (Rosendal, 1973) in ima močno nevraminidazno aktivnost (May in Brown, 2009).

Mycoplasma agalactiae spada med glavne patogene vrste mikoplazem, ki okužujejo koze in ovce. Okužbe z *M. agalactiae* so pogoste v Afriki in mediteranskih državah, najdemo pa jih tudi v ZDA in drugod po svetu. (DaMassa in sod., 1992). Posledice okužbe so mastitis,

presušitev vimena, poliartritis, keratokonjuktivitis, pri kronično okuženih živalih pa tudi pljučnica in splavi (Gil in sod., 2003). Pri *M. agalactiae* so bili opisan imunodominantni protein P40, ki omogoča pritrjevanje na površino celic sinovialnih membran (Fleury in sod., 2002), družina površinskih proteinov Vpma (Glew in sod., 2000) in tudi nukleazna aktivnost (Razin in sod., 1964).

Nukleaze so skupina encimov, ki katalizirajo razgradnjo nukleinskih kislin s hidrolizo fosfodiesterских vezi (Weir, 1993). Nukleaze delimo na ribonukleaze oziroma RNAze, deoksiribonukleaze oziroma DNAze, na nespecifične nukleaze, ki razgrajujejo tako RNA kot DNA, in na endonukleaze ter eksonukleaze (Adams in sod., 1992). Veliko mikoplazemskih vrst sintetizira nukleaze. Nukleazna aktivnost pri mikoplazmah naj bi služila kot mehanizem za pridobivanje prekurzorjev za sintezo nukleinskih kislin, ki jih zaradi reduciranega genoma same niso zmožne sintetizirati. Pri vseh preiskovanih mikoplazmah so identificirali nukleazno aktivnost, povezano z delovanjem nukleaz, ki so vezane na celično membrano (Minion in sod., 1993). Nukleaze različnih mikoplazemskih vrst se med seboj razlikujejo v velikosti in reakcijskih pogojih, predvsem v optimalnem pH in potrebi po dvovalentnih ionih, ki so bistveni za njihovo delovanje (Bendjennat in sod., 1997; Jarvill-Taylor in sod., 1999; Minion in sod., 1993; Pollack in sod., 1965).

1.1 NAMEN DELA

Namen dela je bil ugotoviti, ali imajo bakterije *M. synoviae*, *M. canis*, *M. cynos* in *M. agalactiae* nukleazno aktivnost in ali je nukleazna aktivnost vezana na njihove membrane. Preverjali smo tudi, ali razgradnja izolirane DNA s časom inkubacije z *M. synoviae* narašča ter kako na nukleazno aktivnost testiranih mikoplazem vplivajo kalcijevi in magnezijevi ioni.

V drugem delu poskusa smo preverjali, ali *M. synoviae* po vstopu v žive celice CEC-32 z nukleazno aktivnostjo vpliva na razgradnjo gostiteljeve nativne DNA. Preverjali smo tudi morfološke spremembe in viabilnost celic CEC-32 po okužbi z *M. synoviae*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAZRED *Mollicutes*

V razred *Mollicutes* uvrščamo bakterije, ki jim je skupna odsotnost celične stene, reduciran genom in poenostavljene metabolne poti (Sirand-Pungnet, 2007a). Ime razreda izhaja iz glavne značilnosti teh organizmov – odsotnosti celične stene (latinsko: *mollis* – mehek, *cutis* – koža) (Razin in sod., 1998). So najmanjši znani prokarionti, ki so zmožni samostojne rasti in samostojnega razmnoževanja (Bove, 1993).

Razred je sestavljen iz petih družin, devetih rodov in približno 200 vrst. Večina predstavnikov, z izjemo nekaterih predstavnikov rodu *Acholeplasma*, je obveznih parazitov s specifičnimi gostitelji. Štirje rodovi (*Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma* in *Phytoplasma*) so povezani z rastlinami in insekti, dva rodova (*Anaeroplasma* in *Asteroplasma*) vključujeta anaerobe v govejem vampu, dva rodova (*Mycoplasma* in *Ureaplasma*) pa tvorita družino *Mycoplasmataceae*, katere gostitelji so ribe, ptice, plazilci in sesalci (Johansson in Pettersson, 2002; Sasaki, 2006).

Na podlagi analiz 16S rRNA so ugotovili, da so se predstavniki razreda *Mollicutes* razvili pred približno 600 milijoni let, iz po Gramu pozitivnih bakterij z nizko vsebnostjo gvanina in citozina (G + C) v genomski DNA. Prednik razreda *Mollicutes* je najverjetneje izgubil zmožnost sintetiziranja celične stene, nekatere biosintezne poti in rRNA gene, kar je povzročilo zmanjšanje njegovega genoma. Prednik najverjetneje ni bil obvezni parazit in ni potreboval holesterola za rast in razmnoževanje. Evolucijske študije kažejo, da so se pred približno 470 milijoni let mikroorganizmi razreda *Mollicutes* ločili v dve glavni filogenetski veji – vejo AAP predstavljajo rodovi *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma* in *Phytoplasma*, vejo SEM pa rodovi *Spiroplasma*, *Mesoplasma*, *Entomoplasma*, *Mycoplasma* in *Ureaplasma* (Manillof, 2002).

2.1.1 Taksonomija in filogenija

Razred *Mollicutes* je uvrščen v deblo *Firmicutes*, ki spada v domeno *Bacteria* (Johansson in Pettersson, 2002). Sestavljajo ga družine *Mycoplasmataceae*, *Entomoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeplasmataceae* in *Erysipelotrichaceae*.

Taksonomska razdelitev razreda *Mollicutes* na redove, družine in rodove (Garrity in sod., 2007):

Razred *Mollicutes*

Red *Mycoplasmatales*

Družina *Mycoplasmataceae*

Rod *Mycoplasma*

Rod *Eperythrozoon* (združen z rodом *Mycoplasma*)

Rod *Haemobartonella* (združen z rodом *Mycoplasma*)

Rod *Allobaculum*

Rod *Ureaplasma*

Red *Entomoplasmatales*

Družina *Entomoplasmataceae*

Rod *Entomoplasma*

Rod *Mesoplasma*

Družina *Spiroplasmataceae*

Rod *Spiroplasma*

Red *Acholeplasmatales*

Družina *Acholeplasmataceae*

Rod *Acholeplasma*

Rod *Phytoplasma*

Red *Anaeroplasmatales*

Družina *Anaeroplasmataceae*

Rod *Anaeroplasma*

Rod *Asteroplasma*

Red *Incertae sedis*

Družina *Erysipelotrichaceae*

Rod *Erysipelothrix*

Rod *Bulleidia*

Rod *Holdemania*

Rod *Solobacterium*

Filogenetsko (glede na analizirano 16S rRNA) so predstavniki razreda *Mollicutes* razdeljeni v pet skupin – v skupino anaeroplazem (*Anaeroplasma*), asteroplazem (*Asteroplasma*), hominis (*Hominis*), spiroplazem (*Spiroplasma*) in skupino pneumoniae (*Pneumoniae*). Vsaka skupina je razdeljena na gruče, znotraj teh pa so podgruče (Johansson in Pettersson, 2002). Filogenetske skupine, gruče in podgruče razreda *Mollicutes* so podane v preglednici 1.

Do sedaj je bilo opisanih 180 vrst in podvrst rodu *Mycoplasma* (Vasconcelos in sod., 2005), ki je največji rod v razredu *Mollicutes* (Johansson in Pettersson, 2002). Eden glavnih problemov, povezanih s taksonomijo in filogenijo v rodu *Mollicutes*, je

porazdelitev vrst rodu *Mycoplasma* v štiri od petih filogenetskih skupin – tri skupine vsebujejo tudi predstavnike *Mollicutes* drugih rodov. Rod *Mycoplasma* torej ni monofiletski. *Mycoplasma feliminutum* je uvrščena v skupino anaeroplazem, predstavniki gruče *M. mycoides* pa so uvrščeni v skupino spiroplazem. V skupino pneumoniae je uvrščenih trinajst vrst *Mycoplasma*, več vrst *Candidatus Mycoplasma* in sedem vrst rodu *Ureaplasma*. Samo skupina hominis je sestavljena le iz vrst rodu *Mycoplasma* (Johansson in Pettersson, 2002).

Preglednica 1: Filogenetske skupine, gruče in podgruče razreda *Mollicutes* (Johansson in Pettersson, 2002: 13).

| Skupina | Gruča | Podgruča |
|-------------------|---|---|
| anaeroplasma (17) | <i>Anaeroplasma</i> sp. (4) <i>A. laidlawii</i> (4) <i>A. axanthum</i> (3) <i>Cand. Phytoplasma</i> sp. (6) | |
| asteroplasma (1) | | |
| hominis (86) | <i>M. hominis</i> (21) <i>M. bovis</i> (21) <i>M. equigenitalium</i> (2) <i>M. gypis</i> (1) <i>M. lipophilum</i> (2) <i>M. neurolyticum</i> (11) <i>M. pulmonis</i> (2) <i>M. sualvi</i> (3) <i>M. synoviae</i> (22) <i>Cand. M. ravipulmonis</i> (1) | <i>M. alkalescens</i> (6) <i>M. hominis</i> (15) <i>M. bovis</i> (3) <i>M. bovigenitalium</i> (4) <i>M. felifaucium</i> (2) <i>M. fermentans</i> (2) <i>M. iners</i> (5) <i>M. leopharyngis</i> (2) <i>M. lipofaciens</i> (1) <i>M. opalescens</i> (1) <i>M. spermatophilum</i> (1) |
| spiroplasma (17) | <i>M. mycoides</i> (7) <i>S. apis</i> (6) <i>S. citri</i> (3) <i>S. ixodetis</i> (1) | |
| pneumoniae (29) | Haemotrophic mollicutes (11) <i>M. fastidiosum</i> (2) <i>M. muris</i> (4) <i>M. pneumoniae</i> (7) <i>U. urealyticum</i> (7) | |

Opomba: Številke v oklepajih pomenijo število vrst oziroma podvrst, vendar so sedaj večje, saj so bile po objavi teh podatkov opisane nove vrste.

2.2 ROD *Mycoplasma*

Mikoplazme so najmanjši znani organizmi, ki so zmožni samostojne rasti in samostojnega podvojevanja. Mikoplazemske celice so sestavljene iz celične membrane, ribosomov in krožne dvoverižne DNA molekule, ki je tipično prokariontska. Njihova največja posebnost je majhen genom in odsotnost celične stene, zaradi česar se po Gramu barvajo negativno. Mikoplazme so pleomorfni oblik. Ker jih obdaja le celična membrana, so običajno okrogle oblike, s premerom 0,3 – 0,8 μm . Nekatere vrste mikoplazem so hruškaste oziroma stekleničaste oblike s pritrditvenim organelom na terminalnem delu ali pa tvorijo filamente različnih dolžin, ki so lahko razvejani ali pa v obliki vijačnice. Različne oblike nakazujejo na prisotnost citoskeleta v mikoplazemskih celicah (Razin, 1978). Zaradi odsotnosti celične stene so občutljive na ozmotski šok in detergente, odporne na antibiotike, ki delujejo na sintezo celične stene, kot je penicilin in na agarških gojiščih rastejo v obliki kolonij, ki spominjajo na ocvrto jajce (Razin in Oliver, 1961).

2.2.1 Ekologija in naravni habitati mikoplazem

Mikoplazme so v naravi razširjene kot paraziti ljudi, sesalcev, ptic, plazilcev, rib, členonožcev in rastlin. Živalskim in človeškim mikoplazmam naravni habitat predstavljajo sluznice respiratornega in urogenitalnega trakta, oči, prebavni trakt, mlečne žleze in sklepi. Ker so mikoplazme obvezni paraziti in povsem odvisne od gostitelja, so gostiteljsko in tkivno specifične (Razin in sod., 1998). V gostitelju se pomnožujejo in v njem navadno preživijo dolgo časa (Rottem in Naot, 1998). Okužbe, ki jih povzročajo, so običajno blage in kronične, poškodbe, ki nastanejo ob okužbi, pa so pogosto posledica škodljivih učinkov imunskega odgovora gostitelja (Razin, 1978). Mikoplazme so pogosti kontaminanti celičnih linij. Okužbe težko odkrijemo, saj je navadno prisotnih malo očitnih citopatoloških znakov (Rottem in Barile, 1993).

2.2.2 Genomi mikoplazem

Mikoplazme imajo tipično prokariontski genom, v obliki dvoverižne krožne DNA molekule (Razin in sod., 1998). Zanj je značilna nizka vsebnost citozina in gvanina, ki znaša od 23,77 % GC (*Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*) do 40,00 % GC (*Mycoplasma pneumoniae*) ter visoka vsebnost adenina in timina (Sirand-Pugnet in sod., 2007a). Mikoplazme so mikroorganizmi z najmanjšim genomom, katerega velikost znaša med 580 kbp (*Mycoplasma genitalium*) in 1380 kbp (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC) in variira tako med rodovi kot med sevi iste vrste (Razin in sod., 1998). Do leta 2010 je bilo določenih že 16 genomov mikoplazem (Calderon-Copete in sod., 2009; Dybvig in sod., 2008; Nouvel in sod., 2010; Sirand-Pugnet in sod., 2007a). UGA kodon, ki je univerzalen stop kodon, zaradi reorganizacije genoma in visoke vsebnosti adenina in timina pri mikoplazmah kodira aminokislino triptofan, kar je značilno tudi za mitohondrije

(Osawa in sod., 1992). Zaradi reduciranega genoma počasneje rastejo in sintetizirajo proteine ter so odvisne od hranil gostitelja (maščobnih kislin, holesterola, vitaminov, purinov, pirimidinov in aminokislin). Mikoplazme izven gostitelja ne preživijo dolgo (Razin in sod., 1998).

2.2.3 Metabolizem mikoplazem

Mikoplazme imajo zaradi reduciranega genoma skromne anabolne sposobnosti v primerjavi z ostalimi prokarionti. Njihov genom ne vsebuje genov za biosintezo aminokislin, omejeno število genov je povezanih z biosintezo nukleotidov, kofaktorjev in vitaminov. Večina mikoplazem je nezmožnih sinteze maščobnih kislin in holesterola (Pollack, 2002).

Metabolna aktivnost mikoplazem je primarno povezana s proizvodnjo energije in ne s pridobivanjem substratov za sintezne poti. Pri mikoplazmah Krebsov cikel ne poteka, nimajo kinonov in citokromov, zato oksidativna fosforilacija ne more biti mehanizem pridobivanja ATP (Miles, 1992; Pollack, 1997; Razin, 1978). Z metabolizmom pridobivajo nizke količine ATP in relativno visoke količine končnih metabolnih produktov, kar v nekaterih primerih povzroči izčrpanje specifičnih substratov v gostiteljevih tkivih. Glede na zmožnost metaboliziranja ogljikovih hidratov delimo mikoplazme na fermentativne in nefermentativne. Predstavniki fermentativnih mikoplazem z glikolizo iz ogljikovih hidratov proizvajajo ATP, kisline in znižujejo pH v mediju (Razin in sod., 1998). Piruvat, ki nastaja v glikolizi, se lahko metabolizira do laktata z laktat dehidrogenazo ali do acetil koencima A (acetil-CoA) s piruvat dehidrogenazno potjo (Fraser in sod., 1995; Himmelreich in sod., 1996). Večina nefermentativnih in nekatere fermentativne mikoplazme uporabljajo arginin dihidrolazno pot, kjer nastajajo ornitin, ATP, CO₂ in amonijak, ki povzroča dvig pH v mediju (Razin, 1978). Nekatere mikoplazme kot so *M. agalactiae*, *M. bovigenitalium* in *M. bovis* ne metabolizirajo sladkorjev in arginina, temveč oksidirajo organske kisline do acetata in CO₂ (Miles, 1992; Taylor, 1994).

2.2.4 Membrana mikoplazem

Mikoplazme nimajo celične stene in znotrajceličnih membran. Imajo le plazemsko membrano. To dejstvo je omogočilo študije membran, saj se pri izolaciji plazemske membrane vzorec ne more kontaminirati z ostalimi tipi membran. Za izolacijo mikoplazemskih membran se največkrat uporabljajo tehnike ozmotske lize (Razin, 1978; Razin, 1993).

Približno dve tretjini mase membrane predstavljajo proteini, preostalo pa pretežno lipidi. Mikoplazme imajo v membrani zelo velik delež lipoproteinov, kar ni značilno za ostale prokarionte, saj imajo ti le omejeno število lipoproteinov. Lipoproteini predstavljajo glavne

antigene mikoplazem. Nenavadno visok delež lipoproteinov lahko najverjetneje pripišemo odsotnosti celične stene in periplazemskega prostora, saj je acilacija proteinov z maščobnimi kislinami učinkovit način za sidranje proteinov na celični površini. Membrana mikoplazem je tako kot večina bioloških membran zgrajena iz fosfolipidov, glikolipidov in nevtralnih lipidov. Mikoplazme so delno ali popolnoma nezmožne sinteze maščobnih kislin, zato izkoriščajo gostiteljeve. Za rast potrebujejo holesterol, kar velja za posebnost med prokarionti. Holesterol, ki ga prav tako ne morejo sintetizirati in ga pridobivajo od gostitelja, vpliva na uravnavanje fluidnosti membrane (Razin in sod., 1998).

2.2.5 Gibljivost mikoplazem

Večina mikoplazem je negibljivih, saj na svoji površini nimajo bičkov in pilov. Kljub temu je za nekatere predstavnike rodu *Mycoplasma* značilno polzenje po trdnih površinah. Mehanizem polzenja še vedno ni docela jasen (Miyata in Uenoyama, 2002). Glede na morfologijo celic lahko mikoplazme razdelimo v dve skupini. Prva skupina ima morfološko izrazito polarne celice, s strukturami, ki služijo za pritrjevanje in polzenje po površini. Druga skupina takšnih struktur nima (Miyata in Seto, 1999). Med polzenjem igra pomembno vlogo pritrditveni organel, ki se med gibanjem nahaja na tistem polu bakterije, ki je obrnjen v smer gibanja (Miyata in Uenoyama, 2002).

Povprečna hitrost polzenja je 0,1 $\mu\text{m/s}$ pri *M. genitalium*; 0,3-0,4 $\mu\text{m/s}$ pri *M. pneumoniae* in 2,0-4,5 $\mu\text{m/s}$ pri *M. mobile*, ki je najhitrejša vrsta med mikoplazmami (Kirchhoff, 1992). Na hitrost gibanja *M. mobile* vplivajo starost kulture oziroma oblika celic in temperatura. Podolgovate celice iz starejše kulture se gibajo počasneje (0-0,1 $\mu\text{m/s}$) kot celice iz mlajše kulture (2,5 $\mu\text{m/s}$), ki imajo konično obliko. Hitrost gibanja *M. mobile* linearno narašča s poviševanjem temperature (Miyata in Uenoyama, 2002; Miyata in sod., 2002).

2.2.6 Patogeneza mikoplazem

Mikoplazme so zaradi omejenih metabolnih poti večinoma paraziti in njihove vrste okužujejo le določene gostitelje in njihova tkiva. Po vstopu v gostitelja se razmnožujejo in v njem preživijo zelo dolgo časa. Razvile so mehanizme, ki jim pomagajo pri izmikanju imunskemu sistemu gostitelja in prenosu med gostitelji. Ti mehanizmi vključujejo mimikrijo gostiteljskih antigenov, preživetje znotraj fagocitirajočih in nefagocitirajočih celic ter fenotipsko variabilnost (Rottem, 2003).

Kolonizacija in okužba je pri večini mikoplazem odvisna od pritrditve na gostiteljska tkiva oziroma celice. Najbolje preučena mehanizma pritrjevanja sta pri vrstah *M. pneumoniae*, ki pri ljudeh naseljuje sluznico dihalnih poti in *M. genitalium*, ki pri ljudeh naseljuje urogenitalni trakt. Najpomembnejšo vlogo pri pritrjevanju kot tudi pri polzenju ima pritrditveni organel, ki se nahaja na enem od polov bakterije. Najpomembnejši proteini

organela virulentne *M. pneumoniae*, ki omogočajo pritrjevanje, so adhezin P1 in P30 ter pomožni proteini P40, P90, HMW1 in HMW3 (Dallo in sod., 1990; Dirksen in sod., 1996; Inamine in sod., 1988; Krause, 1996; Krause in sod., 1982). Čeprav pomožni proteini niso adhezini, odsotnost kateregakoli od njih onemogoča pritrjevanje *M. pneumoniae* na gostiteljske celice (Razin in Jacobs, 1992). Nekatere mikoplazme so razvile mehanizme, s katerimi lahko vstopijo v nefagocitirajoče celice in se s tem izognejo gostiteljevemu imunskemu sistemu ter delovanju antibiotikov. Primer takšne bakterije je *M. penetrans*, ki so jo izolirali iz urogenitalnega trakta pacientov z AIDS-om. Bakterija preživi in se deli v citoplazmi ter perinuklearnem prostoru gostiteljskih celic (Lo, 1992; Lo in sod., 1993). Ostale študije so pokazale, da večina mikoplazem po vstopu preživi in se razmnožuje v veziklih gostiteljskih celic (Jensen in sod., 1993; Stadtlander in sod., 1993; Taylor-Robinson in sod., 1991). Za *M. synoviae* je bilo dokazano, da v *in vitro* pogojih invadira nekatere nefagocitirajoče kokošje celice kot so eritrociti, hondrociti in celice CEC-32 (Dušanić in sod., 2009). Odsotnost celične stene omogoča direkten stik med citoplazemsko membrano gostiteljskih celic in mikoplazem. Posledično lahko pod določenimi pogoji pride do zlitja med celicama (Rottem, 2003).

Obstaja več mehanizmov, s katerimi lahko mikoplazme poškodujejo gostiteljske celice:

- I. Mikoplazme so tekom evolucije izgubile skoraj vse gene za biosintezo aminokislin, maščobnih kislin, kofaktorjev in vitaminov, zato te prekursorje za izgradnjo makromolekul prevzemajo od gostitelja, kar lahko vpliva na normalno delovanje gostiteljskih celic. Nefermentativne vrste mikoplazem pridobivajo ATP z arginin dihidrolazno potjo in zelo hitro izčrpajo zaloge arginina, to pa vpliva na sintezo proteinov, rast in celično delitev gostiteljskih celic (Pollack in sod., 1997; Razin in sod., 1998; Rottem in Barile, 1993). Nekateri sevi s porabljanjem arginina posledično preprečijo sintezo histonov in povzročajo poškodbe na kromosomih gostitelja, kot so lom kromosomov, multiple translokacije in redukcija števila kromosomov (McGarrity in sod., 1992; Barile in Rottem, 1993).
- II. Pritrditev mikoplazem na površino gostiteljskih celic lahko ovira dostop do membranskih receptorjev ali pa povzroči spremembo transportnih mehanizmov gostitelja (Rottem, 2003). Celična membrana gostitelja postane izpostavljena toksičnim snovem, ki jih sproščajo pritrjene mikoplazme. Čeprav mikoplazme ne sintetizirajo toksinov, lahko s toksičnimi produkti metabolizma (peroksidom in superoksidnimi radikali) ter citolitičnimi encimi (fosfolipazami) povzročajo poškodbe, ki se velikokrat kažejo v obliki vakuolizacije gostiteljskih celic (Almagor in sod., 1986; Borovsky in sod., 1998; Shibata in sod., 1995).
- III. Poškodbe lahko povzroči tudi zlitje mikoplazemskih celic z gostiteljevimi. Z zlitjem se vsebina mikoplazemskih celic sprosti v citoplazmo gostiteljskih celic in vpliva na normalne funkcije celic. Mikoplazme vsebujejo veliko hidrolitičnih encimov, med katerimi so tudi nukleaze, ki lahko razgradijo DNA evkariontskih

celic (Paddenberg in sod., 1998; Paddenberg in sod., 1996). Poleg nukleaz so pri poškodbi gostiteljskih celic pomembne še proteaze, hemolizin, nevraminidaze in pri *M. alligatoris* tudi hialuronidaza (Brown in sod., 2004). Posledica zlitja je tudi vstavljanje delov mikoplazemske plazemske membrane v membrano gostitelja. S tem se lahko spremenijo prepoznavna receptorska mesta, motena postane indukcija in izražanje citokinov, kar vpliva na medcelično komunikacijo v okuženem tkivu (Rottem, 2003).

Izmikanje imunskemu sistemu je za preživetje mikoplazem znotraj gostitelja zelo pomembno. Obstajata dva mehanizma, ki preprečita učinkovit imunski odziv gostitelja. To sta molekularna mimikrija in fenotipska variabilnost. Molekularna mimikrija se nanaša na antigenske epitope, ki so skupni nekaterim mikoplazmam in gostiteljskim celicam. Ti antigenski epitopi naj bi bili pri okužbah vpleteni pri izmikanju imunskemu sistemu in/ali nastanku avtoimunskih protiteles. Molekularna mimikrija patogenemu mikroorganizmu olajša okužbo, saj ga imunski sistem gostitelja ne prepozna takoj ob vstopu. Posledica je zakasnelost imunskega odziva (Cahill in sod., 1971). Ko imunski sistem gostitelja odgovori na takšne antigenske epitope oziroma mikrobnne antigene, nastala protitelesa navzkrižno reagirajo tudi z enakimi antigenскими determinantami, ki so lastne gostitelju (Rottem, 2003).

Fenotipska variabilnost je pri mikroorganizmih posledica antigenske spremenljivosti. Površinske komponente se spreminjajo z visoko frekvenco, kar je običajna strategija patogenov za preživetje v gostitelju (Rottem, 2003). Zmožnost spreminjanja antigenskega repertoarja in posledično imunogenosti mikoplazmam omogoča, da se uspešno izmikajo gostiteljevemu imunskemu sistemu (Citti in sod., 2005). Ker nimajo celične stene, gibalnih organelov ali pilov, večino spreminjajočih površinskih komponent predstavljajo lipoproteini (Rottem, 2003).

2.3 MIKOPLAZME PRI PTICAH

Trenutno je poznanih 23 vrst mikoplazem, ki okužujejo ptice. Med najboljše raziskanimi so patogene mikoplazme, ki povzročajo bolezni in izgube pri intenzivni reji v perutninski industriji, saj povzročajo veliko ekonomsko škodo. Glavni gostitelji teh patogenih vrst so predvsem kokoši in purani. Med pomembnejše patogene v perutninarstvu spadajo vrste *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma meleagridis* in *Mycoplasma iowae*, ki povzročajo respiratorna in lokomotorna obolenja, zmanjšujejo produkcijo ter kvaliteto mesa pri broilerskih piščancih in zmanjšujejo nesnost ter produkcijo jajc (Bradbury, 2001). Naseljujejo epitelna tkiva v respiratornem in urogenitalnem traktu, s čimer se lahko okužba prenese na embrije oziroma se prenaša z jajci. Okužba embrijev je lahko tudi posledica okužene sperme. Pogosto okužujejo tudi sklepe (Bradbury, 2005). Glavni imunodominantni antigeni, ki jih sintetizirajo te vrste, so

hemaglutinini (Benčina, 2002). Sevi patogenih mikoplazem se razlikujejo v tkivnem tropizmu, invazivnosti in patogenosti, vendar dejavniki, ki prispevajo k takšni raznolikosti, v veliki meri še niso poznani (Berčič in sod., 2008).

2.3.1 *Mycoplasma synoviae*

Mycoplasma synoviae je uvrščena v filogenetsko skupino Hominis (Benčina, 2002) in je eden izmed glavnih patogenih mikroorganizmov kokoši in puranov v perutninski industriji. Okužba se pogosto pojavi kot subklinična okužba zgornjih respiratornih poti in se med jatami ptic prenaša vertikalno preko okuženih jajc. Okužba lahko postane sistemska in se izrazi v obliki artritisa oziroma kužnega sinovitisa, kjer so tarča okužbe sinovialne membrane v sklepih in ovojnice kit. Sinovitis lahko preraste v eksudativni sinovitis, tendovaginitis ali burzitis (Kleven, 1997). Največkrat so prizadeti sklepi na nogah (Cole in sod., 1985). Običajno *M. synoviae* naseljuje epitele respiratornega trakta, lahko pa preko krvnega obtoka potuje v ostale organe, kjer povzroča miokarditis, glomerulonefritis, ekstremno hiranje limfoidnih organov ali pa sistemsko vnetje krvnih žil (Kawakubo in sod., 1980; Kawakubo in sod., 1981; Kleven, 1997). *M. synoviae* sintetizira veliko membranskih antigenov, tudi take, ki so povezani s hemaglutinacijo in hemadsorpcijo piščančjih eritrocitov (Benčina, 2002; Noormohammadi in sod., 1997; Noormohammadi in sod., 1998). Pri večini sevov je bila dokazana nevraminidazna aktivnost (Berčič in sod., 2008) in zmožnost invadiranja nefagocitirajočih kokošjih celic v *in vitro* pogojih (Dušanić in sod., 2009). Okužbo z *M. synoviae* so odkrili tudi pri pegatkah, racah, goseh, golobih, japonski prepelici in rdečenogi jerebici. Dokazan je bil vertikalni prenos okužbe pri vodni perutnini (Benčina in sod., 1987; Benčina in sod., 1988a; Benčina in sod., 1988b; Pascucci in sod., 1976; Poveda in sod., 1990; Recce in sod., 1986). Določen je bil genom seva 53 (Vasconcelos in sod., 2005), podrobneje je bil analiziran ABC transportni operon (Nicolas in sod., 2007) in dokazano je bilo, da genom *M. synoviae* vsebuje veliko insercijskih sekvenc ter transpozicijskih elementov (Loreto in sod., 2007). Faktorji patogenosti *M. synoviae* niso povsem pojasnjeni (Lockaby in sod., 1999), vključujejo pa sposobnost hemaglutinacije (Narat in sod., 1998) in nevraminidazne aktivnosti (Berčič in sod., 2008). Nukleazna aktivnost pri *M. synoviae* še ni opisana.

2.4 MIKOPLAZME PRI PSIH

V zadnjih 70 letih je bilo pri psih izoliranih oziroma odkritih 15 znanih vrst mikoplazem in dve vrsti, ki še nista popolnoma opisani: *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma canis*, *Mycoplasma cynos*, *Mycoplasma edwardii*, *Mycoplasma feliminutum*, *Mycoplasma felis*, *Mycoplasma gateae*, *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma maculosum*, *Mycoplasma molare*, *Mycoplasma opalescens*, *Mycoplasma* sp. HRC689, *Mycoplasma* sp. VJC358, *Mycoplasma spumans* in *Ureaplasma canigenitalium*. Več vrst mikoplazem, ki okužujejo pse, najdemo tudi pri ljudeh in

nekaterih živalih (Chalker, 2005). Zato je leta 1975 Rosendal predlagal, da bi se moral izraz pasje mikoplazme («canine mycoplasma») uporabljati le za tiste vrste rodu *Mycoplasma*, ki so bile izolirane izključno iz psov oziroma pogosto izolirane iz psov in redko iz ostalih gostiteljev (Rosendal, 1975). Vendar pa ob upoštevanju tako stroge omejitve ne bi bilo možno opisati dejanske mikoplazemske flore psov (Chalker, 2005).

Večina pasjih mikoplazem je uvrščenih v filogenetsko skupino Hominis, razen *M. haemocanis* in *U. canigenitalium*, ki sta uvrščeni v skupino Pneumoniae ter *A. laidlawii* in *M. feliminutum*, ki sta uvrščeni v rod *Acholeplasma*. Zaradi težav pri identifikaciji vrst pasjih mikoplazem so pri večini študij ugotavljali le prisotnost ali odsotnost mikoplazem v kliničnih vzorcih. O patogenosti in okužbah, ki jih povzročajo, je znanega zelo malo. Prav tako ni veliko znanega o pritrjevanju na gostiteljska tkiva, o specifičnosti za gostitelja in o načinu prenosa med gostitelji (Chalker, 2005).

Pri vseh psih so mikoplazme odkrili v zgornjem dihalnem traktu, zato predvidevajo, da so del normalne bakterijske flore. Od 20 % do 25 % zdravih psov ima mikoplazme v sapniku in pljučih, medtem ko ima 78 % psov s pljučnimi boleznimi mikoplazme v pljučih (Randolph in sod., 1993; Rosendal, 1982). Pri 30 % psov so mikoplazme del normalne flore debelega črevesa, ni pa znano, ali povzročajo tudi vnetja (Bowe in sod., 1982). *Mycoplasma haemocanis* se pri psih pritrja in raste na površini eritrocitov ter povzroča anemijo (Messick in sod., 2002).

2.4.1 *Mycoplasma canis*

Uvrščena je v filogenetsko skupino Hominis in gručo *Mycoplasma synoviae* (Chalker in Brownlie, 2004). Izolirali so jo iz psov z urogenitalnimi obolenji in neplodnostjo, ni pa znano, ali je povzročitelj teh boleznih (L'Abée-Lund in sod., 2003). Pri poskusnih okužbah z *M. canis* so pri psih inducirali kronični uretritis in epididimitis, pri samicah pa povečano maternico in endometritis oziroma vnetje maternične sluznice (Rosendal, 1982). Tako kot nekatere druge pasje mikoplazme tudi *Mycoplasma canis* nima samo enega gostitelja. Našli so jo pri zdravem govedu in pri govedu z respiratornimi boleznimi (ter Laak in sod., 1993; Nicholas in sod., 1995; Thomas in sod., 2002). Izolirali so jo tudi iz človeka z respiratornim obolenjem (Armstrong in sod., 1971). Tipski sev *M. canis* PG14 sta leta 1951 izolirala Edwards in Fitzgerald (Edwards in Fitzgerald, 1951). *M. canis* fermentira glukozo in ne hidrolizira arginina. Velikost genoma *M. canis* je približno 795 kbp in delež GC baznih parov 28,4-29,1 % (Chalker, 2005). Lahko povzroča hemaglutinacijo oziroma hemadsorbcijo in ima spremenljivo proteolitično aktivnost (Gardella in DelGuidice, 1983). Vsi preučevani sevi *M. canis* oksidirajo glicerol, kjer nastaja vodikov peroksid, ki je eden izmed virulenčnih faktorjev (Megid in sod., 2001). *M. canis* je bila dokazana močna nevraminidazna aktivnost (May in Brown, 2009; Zakrajšek, 2008), nukleazna aktivnost pa še ni bila opisana.

2.4.2 *Mycoplasma cynos*

Uvrščena je v filogenetsko skupino Hominis in gručo *Mycoplasma synoviae* (Chalker in Brownlie, 2004). *Mycoplasma cynos* je edina mikoplazma, ki je pogosto povezana z respiratornimi boleznimi pri psih. Pri eksperimentalnih okužbah in izpostavljanju psov *M. cynos* je prišlo do razvoja pljučnice, poškodb pljučnega epitela in do vdora nevtrofilcev ter makrofagov v pljučne alveole (Rosendal, 1972; Rosendal in Vinther, 1977). Dokazano je bilo, da je prisotnost *M. cynos* v zgornjem in spodnjem respiratornem traktu neposredno povezana z razvojem nalezljivih pljučnih bolezni. Pri psih, ki so imeli zmerne znake bolezni, je bila prisotnost *M. cynos* sorazmerno velika, pri blagih in hujših znakih bolezni pa relativno nizka. To namiguje na to, da je pri okužbi nek drug mikroorganizem izpodrinil *M. cynos*. Okužbe z *M. cynos* so pogoste v tropih psov. Pri mladih psih, ki so mlajši od enega leta, obstaja večja verjetnost okužbe kot pri starejših psih (Chalker in sod., 2004). *Mycoplasma cynos* je bila prvič izolirana iz psov po izbruhu enzootične pljučnice (Rosendal, 1972). Našli so jo v mukoznih membranah vek, zgornjem respiratornem traktu, v pljučnih tkivih ter v genitalnih organih psov in psic. Celice so pleomorfne oblike in na trdnem gojišču rastejo kot kolonije v obliki ocvrtega jajca (Rosendal, 1973). Velikost genoma znaša med 960 in 1010 kbp, delež GC baznih parov pa 25,8 % (Chalker, 2005). *M. cynos* za rast potrebuje holesterol, fermentira glukozo in ne hidrolizira arginina (Rosendal, 1973). Dokazano je bilo, da povzroča hemaglutinacijo (Rosendal, 1973) in ima močno nevraminidazno aktivnost (May in Brown, 2009). Sev 896 *M. cynos*, ki povzroča hujšo obliko pljučnice, so izolirali iz mladičev zlatega prinašalca (Zeugswetter in sod., 2007). Nukleazna aktivnost pri *M. cynos* še ni opisana.

2.5 MIKOPLAZME PRI MANJŠIH PREŽVEKOVALCIH

Mikoplazme, ki okužujejo manjše prežvekovalce, predvsem ovce in koze, pri gostiteljih povzročajo respiratorna obolenja, mastitis, artritis, genitalna obolenja in očesne poškodbe. Iz ovc in koz je bilo izoliranih veliko vrst mikoplazem, toda le za nekatere je bilo dokazano, da povzročajo bolezni. Znanih je 8 patogenih vrst: *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, *Mycoplasma conjunctivae*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, *Mycoplasma ovipneumoniae* in *Mycoplasma putrefaciens*. Dve glavni obolenji malih prežvekovalcev, ki imata zaradi izgub v reji velik ekonomski vpliv, sta CCPP («contagious caprine pleuropneumonia»), ki jo povzroča *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* in CA («contagious agalactia»), katerega glavni povzročitelj je *M. agalactiae* (Nicholas, 2002). Bolezni malih prežvekovalcev, ki jih povzročajo mikoplazme, so pogoste v Afriki in mediteranskih državah, najdemo pa jih tudi v ZDA in drugod po svetu. Pogosto se zgodi, da okužbi s patogenimi mikoplazmami pri ovcah in kozah postavijo napačno diagnozo, saj so simptomi okužbe podobni ostalim bolezenskim stanjem (DaMassa in sod., 1992).

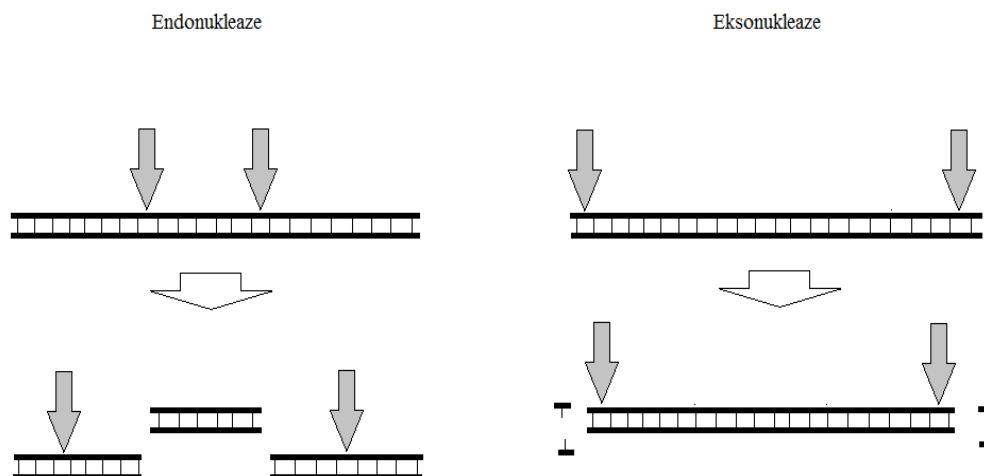
2.5.1 *Mycoplasma agalactiae*

M. agalactiae je uvrščena v filogenetsko skupino Hominis in v gručo *Mycoplasma lipophilum* (Pettersson in sod., 1996). Spada med glavne patogene vrste mikoplazem, ki okužujejo koze in ovce. Je glavni povzročitelj sindroma CA («contagious agalactia»), ki primarno prizadene mlečno žlezo, lahko pa povzroči tudi poškodbe sklepov, oči in pljuč ter v nekaterih primerih tudi genitalnega trakta (Bergonier in Poumarat, 1996; DaMassa in sod., 1992; Gil in sod., 2003). Obolenje je lahko neopazno, blago, akutno ali kronično (Cottew, 1985). Posledice CA so mastitis, presušitev vimena, poliartritis, keratokonjuktivitis, pri kronično okuženih živalih pa tudi pljučnica in splavi (Gil in sod., 2003). Dokazano je bilo, da *M. agalactiae* pri eksperimentalnih pogojih povzroča poškodbe v reproduktivnem traktu okuženih ovnov (Hasso in sod., 1993). Opisana sta bila tudi imunodominantni protein P40, ki omogoča pritrjevanje *M. agalactiae* na površino celic sinovialnih membran (Fleury in sod., 2002) in družina površinskih proteinov Vpma (Glew in sod., 2000). Tipskemu sevu PG2 in sevu 5632 so določili celoten genom (Nouvel in sod., 2010; Sirand-Pugnet in sod., 2007b) in ugotovili, da vsebujeta veliko transpozicijskih elementov (Nouvel in sod., 2010). Inkubacijska doba *M. agalactiae* v kozah in ovcah je od enega do osmih tednov. Okužene živali dobijo vročino, postanejo depresivne in anoreksične. Sledi padec v produkciji mleka, mastitis, presušitev vimena in artritis, predvsem v karpalnih in tarzalnih sklepih (Smith in Sherman, 1994). *M. agalactiae* pri kozah povzroča granularni vulvovaginitis, našli pa so jo tudi v spermi kozlov (de la Fe in sod., 2009; Singh in sod., 1974). Pri *M. agalactiae* je bila nukleazna aktivnost že opisana (Razin in sod., 1964).

2.4 NUKLEAZE

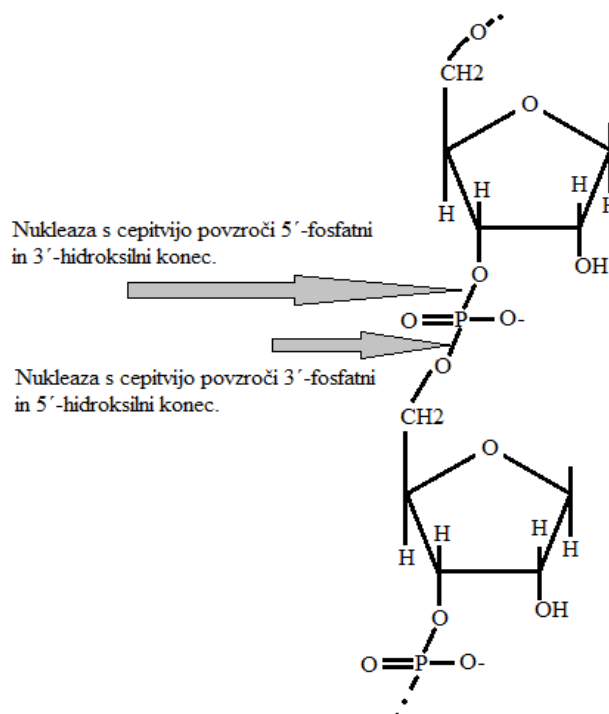
Nukleaze so skupina encimov, ki katalizirajo razgradnjo nukleinskih kislin s hidrolizo fosfodieterskih vezi. Spadajo v večjo skupino encimov – fosfodiesteraz, ki katalizirajo cepljenje fosfatno-esterskih vezi (Weir, 1993). Tri glavne značilnosti delovanja nukleaz so osnova za njihovo klasifikacijo:

- I. Specifičnost za substrat: Nukleaze delimo na ribonukleaze oziroma RNAze (razgrajujejo RNA), deoksiribonukleaze oziroma DNAze (razgrajujejo DNA) in na nespecifične nukleaze, ki razgrajujejo tako RNA kot DNA.
- II. Način delovanja: Nukleaze delimo na endonukleaze in eksonukleaze. Endonukleaze polinukleotide cepijo znotraj polimerne verige. Posledično nastajajo oligonukleotidi, cepljenje verige pa povzroči relativno hitre in velike spremembe na fizičnih lastnostih nukleinskih kislin. Druga skupina nukleaz so eksonukleaze, ki polinukleotide cepijo na koncih polimerne verige in povzročajo nastajanje mononukleotidov. Eksonukleaze imajo na fizične lastnosti nukleinskih kislin manjši vpliv kot endonukleaze.



Slika 1: Princip delovanja endonukleaz in eks nukleaz.

- III. Način cepljenja fosfodiesterske vezi: Nukleaze lahko cepijo polinukleotide na obeh straneh fosfata na fosfodiesterski vezi. Posledično imata lahko verigi, ki sta nastali po cepljenju, 5'-fosfatni in 3'-hidroksilni konec, ali pa 3'-fosfatni in 5'-hidroksilni konec.



Slika 2: Princip cepljenja fosfodiesterske vezi z nukleazami, na obeh straneh fosfata (Adams in sod., 1992: 98).

Obstajajo še drugi kriteriji za uvrščanje nukleaz. To so specifičnost za sekundarno strukturo substrata, smer razgrajevanja eksonukleaz (od 3' proti 5' ali od 5' proti 3') in sposobnost endonukleolitičnega cepljenja vezi (Adams in sod., 1992). Nukleaze lahko cepijo enoverižne in dvoverižne nukleinske kisline. Ta lastnost je največkrat odvisna od koncentracije encima. Če je koncentracija encima, ki je specifičen za cepljenje enoverižne DNA molekule, dovolj visoka, bo encim cepil tudi dvoverižno DNA. Encimi, ki cepijo enoverižne DNA molekule, raje cepijo na mestih, kjer je visok delež AT baznih parov. Nukleaze za delovanje potrebujejo prisotnost kovinskih ionov in optimalen pH, ki je odvisen od tipa nukleaze (Weir, 1993).

V organizmih imajo nukleaze zelo pomembno vlogo pri različnih genetskih mehanizmi. Prisotne so pri podvojevanju in popravilu DNA, pri rekombinacijah in mutagenizi, pri kontroli izražanja genov, pri transpozicijah, translokacijah in ostalih programiranih mehanizmi reorganizacije genov (Friedberg in sod., 1995). So del obrambe, ki gostitelja ščiti pred tujimi molekulami nukleinskih kislin (Kobayashi in sod., 1999). Pomembno vlogo imajo v imunskem sistemu, kjer kontrolirajo sestavljanje imunoglobulinskih genov, njihovo alelno izključevanje in preklapljanje med razredi (Calame in Ghosh, 1995; Hames in Glover, 1996; Zhang in sod., 1995). S tem določajo, ali bodo imunoglobulini vezani na membrano ali se bodo sproščali iz celice, kar povzroča diverzitetu imunoglobulinov in antigensko variacijo. Prisotne so tudi pri nastanku variabilnih regij v lahkih verigah (Hames in Glover, 1996). Dokazano je bilo tudi, da imajo nukleaze vlogo pri razgradnji genske DNA med procesom apoptoze (Arends in sod., 1990).

Z nukleazami so pojasnili nukleosomalno organizacijo evkariontskih kromosomov (Cusick in sod., 1989). Odkritje restriksijskih endonukleaz je pripomoglo k razvoju tehnologij rekombinantne DNA, metod sekvenciranja DNA, razvoju novih metod genetskega mapiranja in k mapiranju človeškega genoma (Williams, 2001). Razvili sta se reverzna genetika, ki je ključna za razumevanje molekularnih osnov razvoja bolezni (Griffiths in sod., 2005) in genska terapija (Friedmann in Roblin, 1972).

2.4.1 Nukleaze pri mikoplazmah

Mikoplazme zaradi reduciranega genoma niso zmožne sintetizirati prekurzorjev za sintezo nukleinskih kislin. Pot orotske kisline za sintezo pirimidinov in encimskih poti za *de novo* sintezo purinskih baz ne poteka. Za rast nujno potrebujejo uracil, timidin in gvanin, ki jih pridobivajo iz okolja (Razin, 1978). Mikoplazemske nukleaze in obstoj aktivnosti cepitve DNA so prvič opisali Razin in sod. (1964). Nukleazna aktivnost pri mikoplazmah naj bi služila kot mehanizem za pridobivanje prekurzorjev za sintezo mikoplazemskih nukleinskih kislin (Minion in sod., 1993). Mikoplazme lahko nukleotidne prekurzorje pridobivajo z razgradnjo gostiteljevih ali mikrobnih nukleinskih kislin (DNA ali RNA), ki se sproščajo v okolje po naravni ali inducirani celični smrti (Schmidt in sod., 2007). Prekurzorje lahko vnašajo v citoplazmo kot proste baze ali pa kot kratke oligonukleotide.

Pri vseh preiskovanih mikoplazmah so identificirali nukleazno aktivnost, povezano z delovanjem nukleaz, ki so vezane na celično membrano. Večina od teh vrst proizvaja multiple nukleolitične proteine (Minion in sod., 1993). Na membrano vezane nukleaze naj bi bile bistvene za rast in preživetje mikoplazem (Minion in Gougen, 1986). Genetske analize so pokazale, da veliko zaporedij, ki določajo nukleaze, ni ohranjenih med mikoplazemskimi vrstami. Nukleaze različnih mikoplazemskih vrst se med seboj razlikujejo v velikosti in reakcijskih pogojih, predvsem v optimalnem pH in potrebi po dvovalentnih ionih, ki so bistveni za njihovo delovanje (Bendjennat in sod., 1997; Jarvill-Taylor in sod., 1999; Minion in sod., 1993; Pollack in sod., 1965). Večina mikoplazemskih nukleaz za delovanje potrebuje magnezijeve in kalcijeve ione ter nevtralen ali šibko bazičen pH in ima atomsko maso v območju med 35 in 70 kDa (Minion in sod., 1993; Paddenberga in sod., 1998).

Podrobna študija biokemijskih lastnosti je bila opravljena na membransko vezani endonukleazi P40, pri bakteriji *Mycoplasma penetrans*. Prečiščena nukleaza je monomerni polipeptid z molekulsko maso 40 kDa, izoelektrično točko 4,1 in optimalnim delovanjem pri pH med 7 in 8. Aktivirajo jo Mg^{2+} in Ca^{2+} ioni, inhibirajo pa Zn^{2+} in Mn^{2+} ioni, EDTA ter EGTA. Ta nukleaza lahko cepi zvito ali linearno dvoverižno DNA, enoverižno DNA in RNA. Endonukleaza P40 je po apliciranju na izolirana jedra človeških limfoblastov povzročila internukleosomalno fragmentacijo kromatina (Bendjennat in sod., 1997). Po apliciranju proteina na kulturo limfocitov so se v primerjavi s kontrolo pojavili številni citopatološki znaki, kot so kondenzacija citoplazme, znižala se je viabilnost limfocitov in pojavila so se apoptotska telesca (Bendjennat in sod., 1999).

Opravljena je bila tudi analiza proteina MnuA bakterije *Mycoplasma pulmonis*. MnuA je nukleaza in je pritrjena ter locirana na zunanji strani mikoplazemske membrane. Gen *mnuA*, ki kodira protein MnuA so klonirali, mu določili nukleotidno zaporedje in analizirali njegovo izražanje v bakteriji *Escherichia coli*. Ni pa še popolnoma jasno, kakšen pomen ima nukleaza MnuA za rast in virulenco *M. pulmonis*. S tehnikami hibridizacije so pokazali, da sekvence gena *mnuA* redko najdemo pri drugih mikoplazemskih vrstah. (Jarvill-Taylor in sod., 1999). Podobna študija je bila opravljena pri analizi membransko vezane eksonukleaze mhp379 pri *M. hyopneumoniae*. Gen, ki kodira ta protein, so klonirali in ga izrazili v *E. coli*. Rekombinanten protein mhp379 ima molekulsko maso 33 kDa, deluje optimalno pri 15 mM koncentraciji Ca^{2+} ionov in ima najboljšo aktivnost pri pH 9,5 (Schmidt in sod., 2007). Protein ima eksonukleazno in endonukleazno aktivnost in lahko cepi enoverižno ali dvoverižno DNA ter RNA. Ob odsotnosti Ca^{2+} ionov nukleazna aktivnost GST-mhp379 ni bila opažena. Nahajanje proteina mhp379 znotraj ABC transportnega operona namiguje, da je nukleazna aktivnost mhp379 pri *M. hyopneumoniae* vpletena pri ABC vnosu prekursorjev nukleinskih kislin. Pri petih mikoplazemskih vrstah so našli homologna zaporedja proteina mhp379 in vsi se nahajajo znotraj ABC transportnega operona, ki je dokaj ohranjen v rodu *Mycoplasma*. Pri homologih proteina mhp379 so ohranjeni predvsem motivi, ki so pomembni za encimsko katalizo. Kot posebnost velja omeniti, da se homologni gen za mhp379 pri bakteriji *M. synoviae* ne

nahaja v neposredni bližini homolognega ABC transportnega operona (Schmidt in sod., 2007). V sekvencah membranske nukleaze mhp379 iz *M. hyopneumoniae* in MnuA iz *M. pulmonis* niso našli nobene podobnosti (Schmidt in sod., 2007).

Izkazalo se je, da sorazmerno veliko mikoplazem poleg znotrajceličnih nukleaz proizvajajo tudi izvencelične nukleaze, ki jih izločajo v okolje (Minion in sod., 1993; Schmidt in sod., 2007). Minion in sod. (1993) so dokazali prisotnost izvenceličnih nukleaz trinajstim mikoplazemskim vrstam. Dokazano je, da nekatere mikoplazemske zunajcelične nukleaze povzročajo internukleosomalno fragmentacijo kromatina pri okuženih celicah (Bendjennat in sod., 1999). Te nukleaze imajo podobne karakteristike kot evkariontske apoptotske nukleaze, saj oboje delujejo v nevtralnemu do šibko bazičnemu pH ter za optimalno delovanje potrebujejo Mg^{2+} in Ca^{2+} ione v mM količinah. Znano je, da mikoplazemske okužbe lahko inducirajo apoptozo podobne znake pri gostiteljskih celicah, vendar povezava med izražanjem mikoplazemskih nukleaz in indukcijo apoptoze pri okuženih celicah še ni pojasnjena (Paddenberga in sod., 1996; Paddenberga in sod., 1998; Sokolova in sod., 1998). Nedavno je bila opravljena študija, kjer so analizirali citotoksično nukleazo Mpn133 iz *M. pneumoniae*. Mpn133 po modifikaciji, kjer so ji odstranili EKS regijo, ni bila zmožna vezave in vstopa v celice, še vedno pa je imela encimsko aktivnost. EKS regija naj bi imela pomembno vlogo pri vstopu in vezavi na celična jedra. To domnevo so še dodatno okrepili, ko so z EKS regijo, konjugirano s proteinom mCherry, v človeških celicah A549 inducirali celično smrt, podobno apoptozi (Somarajan in sod., 2010).

Poleg nukleaz tipa MnuA imajo mikoplazme tudi druge nukleaze, ki so pomembne pri razmnoževanju in podvojevanju DNA ter pri popravljanju napak, ki nastajajo pri sintezi DNA (Carvalho in sod., 2005). Nekatere mikoplazme imajo tudi restriksijsko-modifikacijski sistem (RM), ki omogoča obrambo pred vgraditvijo tuje DNA v genom. Tak sistem so našli pri *M. pulmonis*, *M. synoviae*, *M. pneumoniae*, *U. urealyticum*, *M. penetrans*, *M. gallisepticum*, *M. mobile*, *M. hyopneumoniae*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* in *M. genitalium* (Dybvig in sod., 1998; Brocchi in sod., 2007).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 CELIČNA LINIJA CEC-32 IN BAKTERIJSKE KULTURE

3.1.1 Celična linija CEC-32

Celično linijo piščančjih embrionalnih fibroblastov (CEC-32), ki smo jo uporabili pri poskusih, smo dobili od Prof. Bernda Kaspersa (Münchenska univerza, München, Nemčija). Ista celična linija CEC-32 je bila uporabljena že v prejšnjih poskusih za študije invazije z *M. synoviae* (Dušanić in sod., 2009). Uporabili smo celične kulture, ki so bile v 3–6 pasaži gojenja. Ker so CEC-32 pritrjena celična linija, smo za presajanje celic uporabili standardne celične tehnike (tripsiniziranje, centrifugiranje, odtajevanje, zamrzovanje). Gojili smo jih v kompletnem gojišču, ki je bilo sestavljeno iz osnovnega gojišča Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) z dodanim 8 % fetalnim govejim serumom (FBS), 2 % piščančjim serumom (vse Sigma-Aldrich, Nemčija) in 0,1 % gentamicinom (Krka, Slovenija). Celice smo gojili v CO₂ inkubatorju pri 37 °C in v atmosferi s 5 % CO₂.

3.1.2 Izolacija DNA iz neokuženih celic CEC-32

Nukleazno aktivnost mikoplazem in njihovih membranskih frakcij smo preverjali tako, da smo jih inkubirali skupaj z vzorci DNA, ki smo jo izolirali iz celic CEC-32. Celice CEC-32, ki so bile v 85 % stopnji preraščenosti, smo sprali s HBSS in jim dodali 0,05 % tripsin (oboje Sigma-Aldrich, Nemčija); na eno gojitveno posodo s površino 75 cm² smo dodali 3 ml tripsina. Celice smo nato inkubirali 3 min pri 37 °C, jih sprali s površine gojitvenih posod in prenesli v 10 ml centrifugirke (iz vsake 75 cm² posode v svojo centrifugirko). Centrifugirali smo jih 10 min pri 900 obr./min. Supernatante smo odstranili in posamezno celično usedlino resuspendirali v 6 ml kompletnega gojišča (točka 3.1.1) ter s tem inaktivirali morebitne ostanke tripsina. Ker smo za izolacijo DNA potrebovali 5×10⁶ celic iz vsake 10 ml centrifugirke, smo celice prešteli z uporabo števne komore Bürker-Türk (Assistent, Nemčija) in prenesli ustrezen volumen celične suspenzije v novo 10 ml centrifugirko. Celice v suspenziji smo centrifugirali (TEHTNICA/CENTRIC 322A) 10 min pri 900 obr./min, celično usedlino dvakrat sprali s fosfatnim pufrom (PBS) s pH 7,4 in jo prenesli v 1,5 ml centrifugirko ter izolirali DNA s komercialnim kompletom reagentov Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (10321002, Invisorb, Nemčija) po navodilih proizvajalca (protokol 5). Pri izolaciji smo poleg elementov kompleta reagentov uporabili tudi ribonukleazo A (Sigma-Aldrich, Nemčija, Ribonuclease A Type XII-A, R5500), toplotni stresalnik Eppendorf Thermomixer comfort in centrifugo Eppendorf Centrifuge 5417R. S spektrofotometrom (Shimadzu, UV-160A, UV-Visible Recording Spectrophotometer) smo izmerili koncentracijo izolirane DNA, ki je znašala približno 0,5 µg/µl v 200 µl vsakega od šestih vzorcev. Ker smo za poskus potrebovali vsaj 2 µg/µl DNA, smo vzorce nato skoncentrirali iz 200 µl na 50 µl s koncentradorjem Eppendorf Concentrator 5301, tako da

je bila končna koncentracija DNA vsakega od šestih vzorcev 2 µg/µl. Vzorce izolirane DNA smo shranili na -20 °C.

3.1.3 Gojenje bakterijskih kultur

Pri eksperimentu smo uporabili štiri različne vrste bakterij rodu *Mycoplasma*. Uporabili smo bakterije: *Mycoplasma synoviae*, tipski sev WVU 1853, *Mycoplasma agalactiae*, tipski sev PG2, *Mycoplasma canis*, sev Larissa in *Mycoplasma cynos*, sev 896. Bakterijske kulture smo gojili v dveh tekočih gojiščih: v modificiranem Frey-evem mediju, ki je vseboval 10 % prašičjega seruma (Invitrogen, ZDA), 0,1 % nikotinamid adenin dinukleotida (NAD) in 0,1 % cistein hidroklorida (Sigma-Aldrich, Nemčija) (Dušanić in sod., 2009), ali gojišču za mikoplazme z 10 % konjskim serumom. Gojišče s prašičjim serumom smo uporabili za gojenje *M. synoviae*. Za gojenje ostalih bakterij smo uporabljali obe gojišči. Kulture smo inkubirali pri 37–38 °C do pozne logaritemske faze rasti (Berčič in sod., 2008). Število enot, ki tvorijo kolonije (colony forming units, CFU), smo določili po standardnem postopku (Rodwell in Whitcomb, 1983).

Vse štiri tekoče bakterijske kulture z volumnom 150 ml in 10^8 - 10^9 CFU/ml smo centrifugirali v centrifugi RC5C Sorvall Instruments, Du Pont (rotor GSA), 15 min pri 12000 obr./min, jih redčili v razmerju 1:10 in dobili 200 µl usedline s približno $1,5 \times 10^{10}$ celicami. Vzorce celic mikoplazem smo shranili na -20 °C. Vrste in uporabljeni sevi mikoplazem so navedeni v preglednici 2.

Preglednica 2: Vrste in sevi mikoplazem, ki smo jih uporabili v eksperimentih.

| Vrsta | Sev | Referenca |
|------------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| <i>Mycoplasma synoviae</i> | tipski sev WVU 1853 | Berčič in sod. (2008) |
| <i>Mycoplasma agalactiae</i> | tipski sev PG2 | dobljen iz Francije (od Citti C.) |
| <i>Mycoplasma canis</i> | Larissa | Benčina D. (osebna zbirka) |
| <i>Mycoplasma cynos</i> | 896 | dobljen iz Avstrije (od Spergser J.) |

3.1.4 Priprava membranskih frakcij mikoplazem

Za vsako od mikoplazemskih kultur (preglednica 2) smo pripravili vzorec membranske frakcije s postopkom ozmotske lize ter s cikli zamrzovanja in odtajanja (Razin, 1983).

Posamezno tekočo kulturo z volumnom 75 ml in 10^8 - 10^9 CFU/ml smo centrifugirali (centrifuga RC5C Sorvall Instruments, Du Pont (rotor GSA)) 15 min pri 12000 obr./min. Po centrifugiranju smo supernatant odstranili, usedline celic, v katerih je bilo približno $7,5 \times 10^{10}$ CFU/ml, pa resuspendirali v trikratnem volumnu 0,02 M TRIS-HCl. Suspenzijo celic smo centrifugirali 15 min pri 12000 obr./min in usedlino resuspendirali v 2 M glicerolu ter inkubirali 10 min pri 38 °C. Temu vzorcu smo dodali dvajsetkratni volumen

destilirane vode in inkubirali 15 min pri 38 °C. Vzorce smo nato zamrznili na –85 °C, zatem pa segreli na sobno temperaturo. Postopek zamrzovanja in segrevanja smo ponovili trikrat. Po končani lizi smo vzorce centrifugirali v ultracentrifugi Beckman (rotor TLA 100), 30 min pri 30000 obr./min. Supernatant smo zavrgli, usedlino, ki je vsebovala mikoplazemske membrane, pa resuspendirali v 30 µl fosfatnega pufra (pH 7,2). Tako pripravljene vzorce membran smo shranili na –20 °C.

3.1.5 Priprava vzorcev bakterijskih kultur in membranskih frakcij za testiranje nukleazne aktivnosti

Vzorce celic mikoplazem (točka 3.1.3) in membranskih frakcij (točka 3.1.4) je bilo potrebno pred začetkom eksperimenta ustrezno redčiti. Redčili smo jih v pufru 1, ki je vseboval Mg^{2+} ione, ter pufru 2, ki je vseboval Mg^{2+} in Ca^{2+} ione (sestava pufrov je opisana pod točko 3.2.1). Vzorce celičnih usedlin smo redčili v razmerju 1 : 50, tako da smo po 10 µl usedline, s približno $7,5 \times 10^8$ mikoplazemskimi celicami, prenesli v 490 µl pufra 1 oziroma pufra 2. V vsakem vzorcu, ki je vseboval 500 µl pufra 1 ali pufra 2, je bilo po redčenju približno $1,5 \times 10^7$ mikoplazemskih celic.

Postopek redčenja je bil enak pri pripravi redčin membranskih frakcij. Iz 30 µl pripravljenih membran posameznih mikoplazem, ki smo jih izolirali iz približno $2,25 \times 10^9$ bakterijskih celic, smo prenesli 10 µl membran v 490 µl pufra 1 oziroma pufra 2. V 500 µl pufra 1 in pufra 2 je bila prisotna takšna količina membran posameznih mikoplazem, ki je ustrezala številu membran pri $1,5 \times 10^7$ mikoplazemskih celicah.

Z redčenjem smo si pripravili 13 izhodnih vzorcev mikoplazem in membran, z volumnom 500 µl, ki smo jih uporabili za poskuse razgradnje DNA celic CEC-32.

Preglednica 3: Princip redčenja vzorcev mikoplazem in membran v pufru 1 in pufru 2.

| Vzorec | Volumen pufra 1 in pufra 2 | Volumen usedline vzorca | Redčitev vzorca |
|------------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------|
| Mikoplazemske celice | 490 µL pufra 1 | 10 µL | 1:50 |
| Mikoplazemske membrane | 490 µL pufra 1 | 10 µL | 1:50 |
| Mikoplazemske celice | 490 µL pufra 2 | 10 µL | 1:50 |
| Mikoplazemske membrane | 490 µL pufra 2 | 10 µL | 1:50 |

Preglednica 4: Vzorci mikoplazem in membran, ki smo jih pripravili za poskuse razgradnje DNA celic CEC-32.

| Vzorci mikoplazem in membran | | Pufer 1 | Pufer 2 |
|------------------------------|----------|---------|---------|
| <i>M. synoviae</i> | celice | + | + |
| | membrane | + | + |
| <i>M. agalactiae</i> | celice | + | + |
| | membrane | - | + |
| <i>M. canis</i> | celice | + | + |
| | membrane | - | + |
| <i>M. cynos</i> | celice | + | + |
| | membrane | - | + |

3.2 PREVERJANJE NUKLEAZNE AKTIVNOSTI MIKOPLAZEM Z DNA IZ CELIC CEC-32

Nukleazno aktivnost smo preverjali tako, da smo mikoplazemske celice ali membrane inkubirali z DNA izolirano iz celic CEC-32 in nato analizirali razgradnjo DNA s postopkom elektroforeze na agaroznem gelu.

3.2.1 Vpliv magnezijevih in kalcijevih ionov na nukleazno aktivnost

Prisotnost različnih dvovalentnih ionov, predvsem magnezija in kalcija, ter nevtralen do šibko bazičen pH močno povečajo nukleazno aktivnost mikoplazemskih nukleaz (Minion in sod., 1993; Paddenberga in sod., 1998). Ker nas je zanimalo, kako različna ionska sestava medija vpliva na nukleazno aktivnost testiranih mikoplazem in njihovih membranskih frakcij, smo pred eksperimentom pripravili ustrezne pufre, ki so vsebovali različne dvovalentne ione v mM količinah. Odločili smo se za pripravo dveh pufrov. Pufer 1 je vseboval magnezijeve ione, pufer 2 pa magnezijeve in kalcijeve ione. pH obeh pufrov smo umerili na 7,3 (Minion in sod., 1993). Za pripravo pufrov smo uporabili 50 % založno raztopino glukoze, 1 M založno raztopino $MgCl_2$ in 1 M založno raztopino $CaCl_2$. Natančni sestavi pufrov 1 in 2 sta podani v preglednicah 5 in 6.

Preglednica 5: Kemikalije za pripravo pufru 1.

| Pufer 1 | 30 mL |
|-------------------------|------------------------------|
| 1 % glukoza | 600 µL 50% glukoze [5 g/mL] |
| 10 mM MgCl ₂ | 300 µL 1 M MgCl ₂ |
| 1×PBS (pH=7,4) | 29,1 mL |
| pH | 7,3 |

Preglednica 6: Kemikalije za pripravo pufru 2.

| Pufer 2 | 30 mL |
|------------------------|------------------------------|
| 1 % glukoza | 600 µL 50% glukoze [5 g/mL] |
| 5 mM MgCl ₂ | 150 µL 1 M MgCl ₂ |
| 5 mM CaCl ₂ | 150 µL 1 M CaCl ₂ |
| 1×PBS (pH=7,4) | 29,1 mL |
| pH | 7,3 |

Vpliv Ca²⁺ in Mg²⁺ ionov smo ugotavljali tako, da smo nukleazno aktivnost mikoplazem in njihovih membran testirali v pufru 1 in v pufru 2 (točka 3.1.5).

3.2.2 Preverjanje nukleazne aktivnosti *M. synoviae*

Pri prvem poskusu preverjanja nukleazne aktivnosti smo primerjali vpliv pufru 1 in pufru 2 na nukleazno aktivnost *M. synoviae* pri štirih različnih časih inkubacije. Poskus smo opravljali v plastičnih 0,5 ml mikrocentrifugirkah (Eppendorf). V posamezno mikrocentrifugirko smo nanesti 10 µl skoncentrirane DNA, izolirane iz celic CEC-32, in po 10 µl suspenzije celic *Mycoplasma synoviae* v pufru 1 oziroma pufru 2, redčene v razmerju 1 : 50. Ker nas je zanimalo, kako različni časi inkubacije vplivajo na intenziteto fragmentacije DNA, smo vzorce inkubirali 30 min, 1 uro, 2 uri ali 4 ure pri 37 °C. Nato smo reakcijo ustavili s 3 min pregrevanjem vzorcev na 100 °C ter vzorce centrifugirali 10 min pri 12000 obr./min (Eppendorf Centrifuge 5417R), da so se bakterijske celice posele. Supernatante, v katerih je bila DNA in njeni fragmenti, smo shranili na -20 °C in jih kasneje analizirali z elektroforezo v agaroznem gelu.

Nukleazno aktivnost membran *M. synoviae* smo preverjali v obeh pufrih, pri 2 urni inkubaciji, po podobnem protokolu. V posamezno mikrocentrifugirko smo nanesti 10 µl skoncentrirane DNA iz celic CEC-32 in po 10 µl vzorca membranskih frakcij, redčenega v pufru 1 oziroma pufru 2. Vzorca smo nato inkubirali 2 uri na 37 °C in reakcijo ustavili s 3

min pregrevanjem na 100 °C. Po inaktivaciji smo vzorca shranili na –20 °C do nanosa na elektroforetski gel.

3.2.3 Preverjanje nukleazne aktivnosti *M. agalactiae*, *M. canis* in *M. cynos*

Pri drugem poskusu smo primerjali vpliv pufru 1 in pufru 2 na nukleazno aktivnost bakterij *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma canis* in *Mycoplasma cynos* pri 2 urni inkubaciji. Poskus smo opravljali v plastičnih 0,5 ml mikrocentrifugirkah (Eppendorf). V posamezno mikrocentrifugirko smo nanесли 10 µl skoncentrirane DNA iz celic CEC-32 in po 10 µl suspenzije celic *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma canis* in *Mycoplasma cynos*, redčenih v pufru 1 oziroma pufru 2, v razmerju 1 : 50. Vzorce smo inkubirali 2 uri na 37 °C in reakcijo ustavili s 3 min pregrevanjem na 100 °C. Vzorce smo nato centrifugirali 10 min pri 12000 obr./min (Eppendorf Centrifuge 5417R), da so se bakterijske celice posedle. Supernatante, v katerih je bila DNA in njeni fragmenti, smo shranili na –20 °C do nanosa na elektroforetski gel.

Nukleazno aktivnost membran *M. agalactiae*, *M. canis* in *M. cynos* smo preverjali le v pufru 2, pri 2 urni inkubaciji, po podobnem protokolu. V mikrocentrifugirko smo nanесли 10 µl skoncentrirane DNA CEC-32 celic in po 10 µl vzorcev membranskih frakcij, redčenih v pufru 2. Vzorce smo nato inkubirali 2 uri na 37 °C in reakcijo ustavili s 3 min pregrevanjem na 100 °C. Po inaktivaciji smo vzorce shranili na –20 °C do nanosa na elektroforetski gel.

3.2.4 Priprava negativnih in pozitivnih kontrol za poskus nukleaznih aktivnosti

Pri vsakem poskusu preverjanja nukleazne aktivnosti, smo posebej pripravili tudi negativno in pozitivno kontrolo. Negativno kontrolo smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko nanесли 10 µl skoncentrirane DNA iz celic CEC-32 in 10 µl pufru Elution Buffer D (Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (50), 10321002). Vzorec smo shranili na –20 °C do nanosa na elektroforetski gel.

Za pripravo pozitivne kontrole smo v mikrocentrifugirko nanесли 26 µl skoncentrirane DNA iz celic CEC-32 in 2 µl DNaseI (Fermentas, Deoxyribonuclease I (DNaseI), RNase free, EN0521). Vzorec smo inkubirali 5 min na 37 °C in ustavili reakcijo s 3 min pregrevanjem na 100 °C. Vzorec smo shranili na –20 °C do nanosa na elektroforetski gel.

3.2.5 Agarozna gelska elektroforeza – analiza razgradnje DNA iz poskusov preverjanja nukleaznih aktivnosti

S postopkom elektroforeze smo v gelu ločili fragmente DNA celic CEC-32 po inkubaciji DNA z mikoplazmami in njihovimi membranami. Za ločevanje smo uporabili agarozno gelsko elektroforezo, ki se uporablja kot standardna metoda za ločevanje fragmentov nukleinskih kislin in določitev njihove velikosti.

3.2.5.1 Priprava vzorcev za analizo razgradnje DNA iz poskusov preverjanja nukleaznih aktivnosti

Kot vzorce smo uporabili supernatante mikoplazemskih celic in DNA oziroma mešanice membran in DNA po končanih poskusih preverjanja nukleaznih aktivnosti. Posamezni vzorec za nanos na elektroforetski gel smo pripravili tako, da smo 5 μ l raztopljene DNA mešali z 1 μ l nanašalnega barvila (Fermentas, 6X Loading Dye Solution, R0611). Na gel smo nanесли 6 μ l posameznega vzorca.

Referenčni molekularni označevalec smo potrebovali za določitev velikosti fragmentov DNA, ki smo jih ločevali. Uporabili smo mešanico kromatografsko očiščenih, različno dolgih posameznih DNA fragmentov, velikosti od 100 do 10000 baznih parov (Fermentas, GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use, SM0333). V eno stezo agaroznega gela smo nanесли 3 μ l molekularnega označevalca.

3.2.5.2 Pogoji in potek elektroforeze za analizo razgradnje DNA iz poskusov preverjanja nukleaznih aktivnosti

DNA fragmente smo ločevali v 1,8 % agaroznem gelu. Za pripravo 60 ml gela smo v 60 ml 0,5 % TBE pufra dodali 1,08 g agaroze (SeaKem® LE Agarose, Lonza, Švica) in jo raztopili v mikrovalovni pečici. Pred vlivanjem gela v nosilec smo raztopini dodali 2 μ l barvila za barvanje DNA, SYBR Safe (Invitrogen, SYBR™ Safe DNA Gel Stain 10.000X concentrate in DMSO, S33102). Gel smo nato vlili v nosilec in nanj namestili glavnik, preden se je gel strdil. Ko se je gel strdil, smo odstranili glavnik in gel skupaj z nosilcem prenesli v elektroforetsko napravo ter nanj nanесли vzorce. Ločevanje DNA fragmentov je s pomočjo elektroforetskega pufra potekalo v agaroznem gelu, pri 100 V (50 mA), od 20 do 25 minut. Po končani elektroforezi smo gel prenesli v UV transiluminator – napravo, namenjeno fotografiranju elektroforetskih gelov (SYNGENE, U:Genius), da so vzorci DNA in njeni fragmenti postali vidni. Gel smo fotografirali s fotoaparatom, ki je sestavni del naprave in dobljene slike ustrezno oblikovali s programsko opremo, nameščeno na aparatu ter jih shranili za nadaljnjo uporabo.

3.3 PREVERJANJE NUKLEAZNE AKTIVNOSTI *M. synoviae* NA NATIVNI DNA V CELICAH CEC-32 *in situ*

Nukleazno aktivnost smo preverjali tako, da smo žive celice CEC-32 okužili in inkubirali z *M. synoviae* ter po različnih časih inkubacije analizirali genomsko DNA s postopkom elektroforeze na agaroznem gelu. Ker smo uporabili žive celice CEC-32 in živo bakterijo, smo ta poskus opredelili kot poskus *in situ*. V sklopu poskusa preverjanja nukleazne aktivnosti na nativni DNA *in situ* smo preverjali tudi morfološke spremembe in viabilnost celic CEC-32 po okužbi.

3.3.1 Okužba celic CEC-32

V poskusu smo preverjali, ali nukleazna aktivnost *M. synoviae* vpliva na razgradnjo nativne DNA po tem, ko bakterija vstopi v žive kokošje celice. Poleg okuženih celic smo si pripravili še neokužene celice, ki so nam služile kot negativna kontrola, in celice, v katerih smo umetno sprožili apoptozo s 5-fluorouracilom (5-FU). Te so nam služile kot pozitivna kontrola, pri katerih bi morala biti DNA razgrajena zaradi procesov apoptoze. DNA iz okuženih celic CEC-32, celic negativne in pozitivne kontrole smo izolirali 24, 48, 72 in 96 ur po okužbi oziroma po začetku poskusa.

Poskus smo opravili v dveh 6-lukenjskih gojitvenih ploščah (»6-well plate«) (TPP, Švica). V vsako luknjo plošče smo nasadili ustrezno število celic CEC-32, ki smo jim predhodno določili 99 % viabilnost, tako, da je bilo ob izolaciji DNA v vzorcih 5×10^6 celic. V luknje, kjer je potekala okužba, smo celicam CEC-32 dodali po 2 ml kompletnega gojišča brez dodanih antibiotikov (točka 3.1.1). V ostale luknje gojitvenih plošč pa smo celicam CEC-32 dodali po 2 ml kompletnega gojišča z dodanim 0,1 % gentamicinom (Krka, Slovenija). V štirih luknjah smo celice CEC-32 okužili z *M. synoviae* WVU 1853. Na celice smo nanesti po 500 μ l skoncentrirane bakterijske kulture, ki je vsebovala 10^8 – 10^9 CFU. Razmerje celic v luknji je znašalo od 10 do 100 celic mikoplazem na eno celico CEC-32. V štirih luknjah smo pri celicah CEC-32 umetno sprožili apoptozo z dodajanjem 4 μ l 5-FU (Sigma-Aldrich, Nemčija) s koncentracijo 10 mg/ml, da je bila končna koncentracija 5-FU v posamezni luknji plošče 20 μ g/ml. V štirih luknjah smo gojili celice negativne kontrole. Po 24, 48, 72 in 96 urah smo izolirali DNA po enega vzorca celic CEC-32, od vsake poskusne skupine (preglednica 7). Celice CEC-32 smo inkubirali v CO₂ inkubatorju (SANYO CO₂ Incubator) pri 37 °C in v atmosferi s 5 % CO₂. Celice smo vsak naslednji dan po okužbi dohranili s 500 μ l svežega kompletnega gojišča, v vsako luknjo plošče.

Preglednica 7: Prikaz poteka izolacij DNA iz celic CEC-32.

| Vzorec celic CEC-32 | Izolacija DNA iz celic CEC-32 po inkubaciji. | | | |
|------------------------------|--|-------|-------|-------|
| | 24 ur | 48 ur | 72 ur | 96 ur |
| Okužene z <i>M. synoviae</i> | + | + | + | + |
| Neokužene (Neg. kontrola) | + | + | + | + |
| Dodan 5-FU (Poz. kontrola) | + | + | + | + |

3.3.2 Izolacija DNA iz okuženih celic

Za izolacijo smo uporabili protokol, ki temelji na izolaciji DNA s fenol-kloroformom. DNA smo iz celic CEC-32 izolirali 24, 48, 72 in 96 ur po okužbi. DNA smo izolirali iz celic, ki so bile okužene z *M. synoviae* ter iz celic pozitivne in negativne kontrole.

Pred izolacijo DNA smo morali celice odstraniti iz lukenj gojitvene plošče. Iz luknje smo odstranili izrabljeno gojišče, ga prenesli v 10 ml centrifugirko in ga centrifugirali 10 min pri 1200 obr./min v centrifugi TEHTNICA/ŽELEZNIKI PLC-322, da so se odlepljene celice posele. Supernatant smo odstranili, usedlino celic pa resuspendirali v 50 µl PBS. Celice v luknjah smo sprali s PBS, jih postrgali s plastičnim strgalom, prenesli v 1,5 ml centrifugirke in jih združili s 50 µl celične suspenzije, ki smo jo pripravili iz usedline po centrifugiranju.

Suspenzijo celic iz posamezne luknje 6-lukenjske plošče smo centrifugirali 5 min pri 1200 obr./min, v centrifugi Eppendorf Centrifuge 5417R. Usedlino celic posameznega vzorca smo nato enkrat sprali s PBS in celice resuspendirali v 800 µl TE pufra (10 mM Tris (pH 8), 2 mM EDTA). Suspenzijo smo centrifugirali 30 s pri 12000×g. Postopek spiranja celic s TE pufrom smo ponovili trikrat. Celično usedlino smo po zadnjem spiranju resuspendirali v 200 µl liznega pufra (0,5 % SDS, 10 mM Tris (pH 8), 2 mM EDTA, 400 mM NaCl), ji dodali 4 µl proteinaze K (Fermentas, Proteinase K, EO0491) in jo inkubirali 2 uri pri 56 °C, v toplotnem stresalniku Eppendorf Thermomixer comfort. Po inkubaciji smo suspenziji dodali 125 µl fenola in 125 µl mešanice kloroforma z izo-amil alkoholom, v razmerju 24 : 1. Vzorec smo dobro premešali in ga centrifugirali 11 min pri 14000×g. Zgornjo fazo raztopine smo prenesli v novo 1,5 ml centrifugirko in ji dodali 230 µl kloroforma z izo-amil alkoholom, v razmerju 24 : 1. Vzorec smo centrifugirali 10 min pri 14000×g in prenesli zgornjo fazo raztopine v novo 1,5 ml centrifugirko, ki smo ji dodali 500 µl 96 % etanola, ohlajenega na –20 °C. Vzorec smo rahlo pretresli in ga inkubirali 30 min na –20 °C. Po inkubaciji smo vzorec centrifugirali 10 min pri 10000×g, odstranili supernatant in usedlini dodali 500 µl 70 % etanola. Vzorec smo nato centrifugirali 7 min pri 10000×g, odstranili supernatant in usedlino posušili do voskaste konsistence, ki smo jo raztopili v 30 µl miliQ vode. Vzorce smo shranili na –20 °C do analize DNA z elektroforezo.

Ker s protokolom, ki temelji na izolaciji DNA s fenol-kloroformom, nismo dobili želenih rezultatov, smo pri nadaljnjem delu DNA iz celic CEC-32 izolirali s komercialnim kompletom za izolacijo apoptotske DNA (Invitrogen, *ApoTarget*TM Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit (50), KHO1021). Izolacijo DNA smo opravili skladno z navodili proizvajalca. Vzorce izolirane DNA smo shranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, do analize DNA z elektroforezo.

3.3.3 Agarozna gelska elektroforeza – analiza DNA iz poskusov preverjanja nukleazne aktivnosti na nativni DNA *in situ*

S postopkom elektroforeze smo v gelu ločili fragmente DNA iz okuženih celic CEC-32, iz neokuženih celic in iz celic, v katerih smo inducirali apoptozo. Za ločevanje smo uporabili agarozno gelsko elektroforezo, ki se uporablja kot standardna metoda za ločevanje fragmentov nukleinskih kislin in določitev njihove velikosti.

3.3.3.1 Priprava vzorcev za analizo DNA iz poskusov preverjanja nukleazne aktivnosti na nativni DNA *in situ*

Kot vzorce smo uporabili DNA, ki smo jo izolirali iz okuženih celic CEC-32, negativnih in pozitivnih kontrol po končanih poskusih preverjanja nukleazne aktivnosti na genomski DNA. Na elektroforetski gel smo nanašali vzorce DNA, resuspendirane v puftru DNA Suspension Buffer iz komercialnega kompleta reagentov Invitrogen, *ApoTarget*TM Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit ((50), KHO1021)). Na gel smo nanесли 20 μl posameznega vzorca.

Za referenčni označevalec smo uporabili mešanico kromatografsko očiščenih, različno dolgih individualnih DNA fragmentov, velikosti od 100 do 10000 baznih parov (Fermentas, GeneRulerTM DNA Ladder Mix, ready-to-use, SM0333). V eno stezo agaroznega gela smo nanесли 3 μl referenčnega označevalca.

3.3.3.2 Pogoji in potek elektroforeze za analizo DNA iz poskusov preverjanja nukleazne aktivnosti na nativni DNA *in situ*

DNA fragmente smo ločevali v 1,2 % agaroznem gelu. Za pripravo 85 ml gela, smo v 85 ml 0,5 % TBE puftra dodali 1,02 g agaroze (SeaKem® LE Agarose, Lonza, Švica) in jo raztopili v mikrovalovni pečici. Pred vlivanjem gela v nosilec, smo raztopini dodali raztopino etidijevega bromida (Sigma-Aldrich, Nemčija), tako da je bila končna koncentracija v gelu 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Gel smo nato vlili v nosilec in nanj namestili glavnik, preden se je gel strdil. Ko se je gel strdil, smo odstranili glavnik in gel skupaj z nosilcem prenesli v elektroforetsko napravo ter nanj nanесли vzorce. Ločevanje DNA fragmentov je

potekalo v agaroznem gelu, pri 50 V, 40 minut. Po končani elektroforezi smo gel slikali na UV transiluminatorju (SYNGENE, U:Genius). Dobljene slike smo ustrezno oblikovali s programsko opremo in jih shranili za nadaljnjo uporabo.

3.3.4 Preverjanje vpliva okužbe z *M. synoviae* na morfologijo celic CEC-32

Morfološke spremembe na celicah CEC-32 smo preverjali 24 ur po okužbi z *M. synoviae*. Celice, gojene v 6-lukenjski plošči, smo opazovali in fotografirali z invertnim mikroskopom (Nikon, ECLIPSE, TE2000-U), pri 200× povečavi. Med seboj smo primerjali okužene celice in celice iz lukenj negativnih kontrol.

3.3.5 Določanje viabilnosti celic CEC-32

Celicam CEC-32 smo določali viabilnost s testom XTT (Sigma-Aldrich, In Vitro Toxicology Assay Kit, XTT based, TOX2). Test smo naredili po navodilih proizvajalca. Posamezen vzorec smo testirali v treh ponovitvah za vsak dan inkubacije. Viabilnost smo določali celicam, ki smo jih okužili z *M. synoviae*, celicam, katerim smo inducirali apoptozo s 5-FU, in neokuženim celicam. V posamezno luknjo 96-lukenjske plošče (TPP, Švica) smo nasadili 3×10^5 celic CEC-32, ki smo jih gojili v 200 μ l gojišča RPMI z 8 % FBS (oboje Sigma-Aldrich, Nemčija) in jih inkubirali v CO₂ inkubatorju (SANYO CO₂ Incubator) pri 37 °C in v atmosferi s 5 % CO₂. Pri okuženih celicah CEC-32 je razmerje celic v luknji je znašalo od 10 do 100 celic mikoplazem na eno celico CEC-32, končna koncentracija 5-FU pri pozitivni kontroli pa je bila 20 μ g/ml v 200 μ l gojišča na luknjo plošče. Pred merjenjem smo v posamezno luknjo 96-lukenjske plošče dodali reagent XTT (volumen je bil enak 20 % volumna gojišča v luknji) in vzorce inkubirali približno 3,5 ure na 37 °C, do razvoja barve. Absorbanco vzorcev smo izmerili s spektrofotometrom (BIO-TEK, EL808) pri 450 nm. Merili smo jo 24, 48, 72 in 96 ur po okužbi oziroma po začetku poskusa. Vzoredno smo si pripravili različne koncentracije oziroma redčitveno vrsto neokuženih celic CEC-32, ki smo jih po enakem postopku nacepili na 96-ploščo in so nam služile kot standard za izračun števila celic v preiskovanih vzorcih. Absorbanco smo merili po enakem postopku kot pri poskusnih vzorcih. Iz izmerjenih absorbanc in podatkov o številu celic v redčitveni vrsti smo narisali diagram, s pomočjo katerega smo izračunali število in odstotek viabilnih celic v preiskovanih vzorcih glede na njihovo izhodiščno število.

Preglednica 8: Celoten pregled opravljenih testov, ki smo jih opravili z posameznimi mikoplazemskimi vzorci.

| Vzorci mikoplazem Opravljeni testi | MS- cel ³ | MS- mem ⁴ | MA- cel | MA- mem | MCa- cel | MCa- mem | MCy- cel | MCy- mem |
|--|-------------------------|-------------------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Vpliv različnih časov inkubacije na intenziteto nukleazne aktivnosti | + ¹ | NT ² | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Vpliv pufra 1 na nukleazno aktivnost | + | + | + | NT | + | NT | + | NT |
| Vpliv pufra 2 na nukleazno aktivnost | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Vpliv na fragmentacijo DNA v živih celicah CEC-32 | + | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Vpliv okužbe na morfološke spremembe celic CEC-32 | + | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Vpliv na viabilnost celic CEC-32 | + | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |

¹ Testirano

² Ni testirano

³ Celice mikoplazem

⁴ Membrane mikoplazem

Kratice: MS, *M. synoviae*; MA, *M. agalactiae*; MCa, *M. canis*; MCy, *M. cynos*.

4 REZULTATI

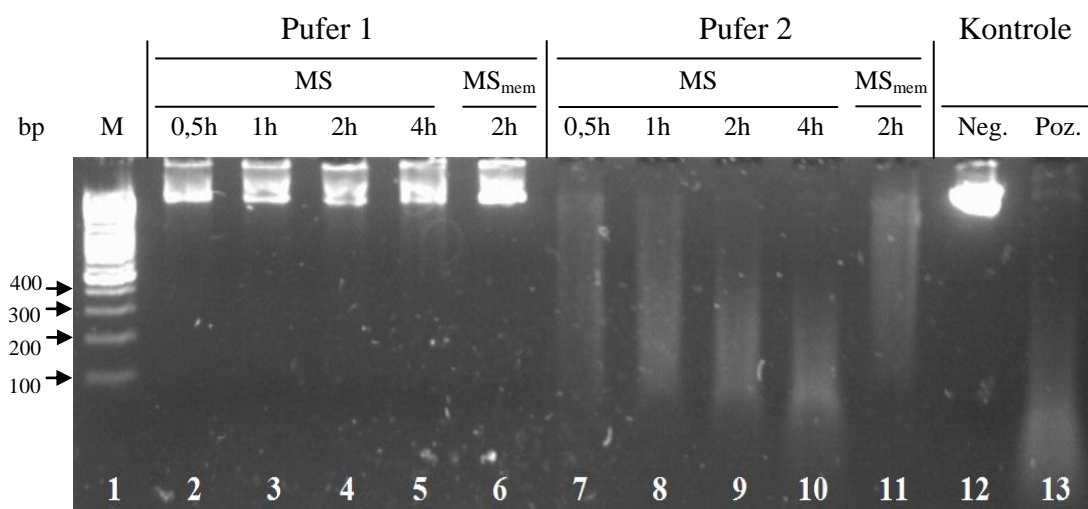
4.1 PREVERJANJE NUKLEAZNE AKTIVNOSTI MIKOPLAZEM NA IZOLIRANI DNA

4.1.1 Nukleazna aktivnost *M. synoviae*

Pri prvem od obeh poskusov preverjanja nukleazne aktivnosti na izolirani DNA smo ugotavljali nukleazno aktivnost bakterije *Mycoplasma synoviae* in primerjali vpliv pufru 1 in pufru 2 pri štirih različnih časih inkubacije. Nukleazno aktivnost membran *M. synoviae* smo preverjali v obeh pufrih, pri 2 urni inkubaciji. Mikoplazme in njihove membrane v pufru 1 in pufru 2 smo testirali na izolirani DNA iz celic CEC-32.

Na sliki 3 lahko vidimo fragmentirane vzorce DNA celic CEC-32, ki so nastali kot posledica nukleazne aktivnosti *M. synoviae* (MS) v pufru 1 (steze vzorcev 2-5) in pufru 2 (steze vzorcev 7-10), pri različnih časih inkubacije. Fragmente DNA smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo. Inkubacije *M. synoviae* z izolirano DNA so trajale 30 min, 1 uro, 2 uri in 4 ure. S tem smo želeli preveriti, ali nukleazna aktivnost narašča s časom trajanja inkubacije. Z inkubacijo v pufru 1 in pufru 2 smo tudi preverjali, kakšen vpliv imajo Mg^{2+} in Ca^{2+} ioni na fragmentacijo DNA.

Dokazali smo, da ima bakterija *Mycoplasma synoviae* nukleazno aktivnost in da sintetizira funkcionalne nukleaze. Obenem smo dokazali, da nukleazna aktivnost narašča s časom trajanja inkubacije. To je razvidno iz velikosti fragmentov razgrajene DNA oziroma iz intenzitete fragmentacije, saj so bili ob daljšem času inkubacije v vzorcu prisotni vedno krajši fragmenti DNA.



Legenda:

1– DNA molekularni označevalac (M) (Fermentas, SM0333).

2– DNA, inkubirana z MS v pufu 1, pri 30 min inkubaciji.

3– DNA, inkubirana z MS v pufu 1, pri 1 h inkubaciji.

4– DNA, inkubirana z MS v pufu 1, pri 2 h inkubaciji.

5– DNA, inkubirana z MS v pufu 1, pri 4 h inkubaciji.

6– DNA, inkubirana z MS_{mem} v pufu, 1 pri 2 h inkubaciji.

7– DNA, inkubirana z MS v pufu 2, pri 30 min inkubaciji.

8– DNA, inkubirana z MS v pufu 2, pri 1 h inkubaciji.

9– DNA, inkubirana z MS v pufu 2, pri 2 h inkubaciji.

10– DNA, inkubirana z MS v pufu 2, pri 4 h inkubaciji.

11– DNA, inkubirana z MS_{mem} v pufu 2, pri 2 h inkubaciji.

12– Negativna kontrola (DNA in puffer).

13– Pozitivna kontrola (DNA inkubirana z DNazoI (Fermentas, EN0521)).

Slika 3: Analiza nukleazne aktivnosti *M. synoviae* (MS) in njenih membran (MS_{mem}) v pufu 1 (10 mM MgCl₂) in pufu 2 (5 mM MgCl₂ in 5 mM CaCl₂) po inkubaciji od 30 min do 4 ur. Substrat je bila DNA izolirana iz celic CEC-32. DNA smo barvali z barvilom SYBR Safe (Invitrogen, S33102) in jo analizirali v 1,8 % agaroznem gelu. Gel smo slikali v UV-transiluminatorju (SYNGENE, U:Genius). Na sliki so označene dolžine fragmentov molekularnega označevalca (od 100 do 400 bp).

Dokazali smo, da imajo membrane *M. synoviae* (MS_{mem}) nukleazno aktivnost (slika 3, stezi vzorcev 6 in 11). Vzorci z membranami so imeli šibkejšo nukleazno aktivnost kot mikoplazemske celice, kar je razvidno na sliki 3. Različna intenziteta fragmentacije DNA, ki so jo povzročile celice in membrane MS, je lepo vidna, če primerjamo velikost fragmentov v pufu 2, pri 2 urni inkubaciji (stezi vzorcev 8 in 11). Z dobljenimi rezultati smo dokazali, da so nukleaze *M. synoviae* vezane tudi na membrano mikoplazemskih celic.

4.1.1.1 Vpliv Ca^{2+} in Mg^{2+} na nukleazno aktivnost *M. synoviae* in njenih membran

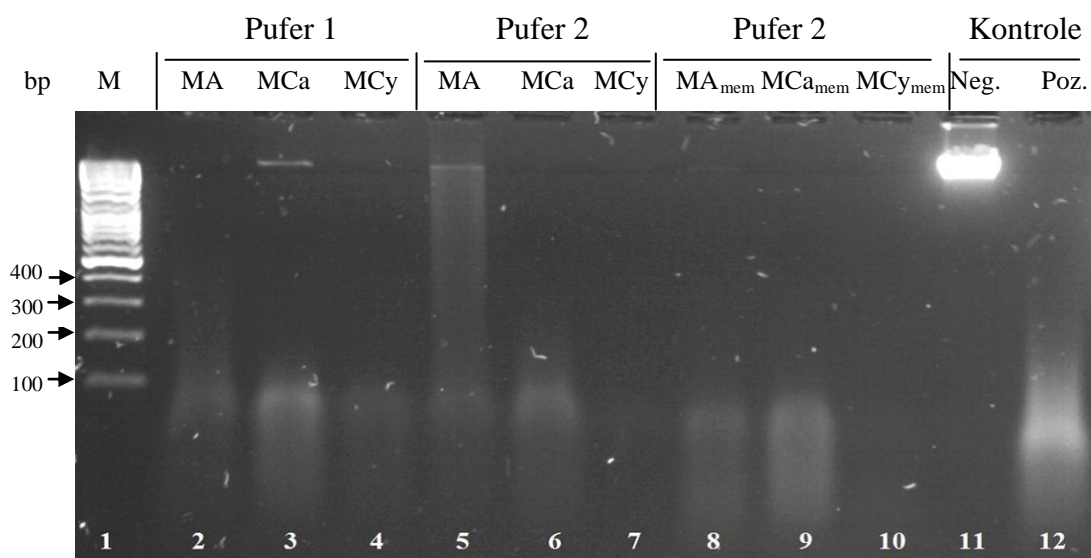
Vpliv Ca^{2+} in Mg^{2+} ionov na nukleaze in posledično na nukleazno aktivnost smo preverjali z inkubacijo *M. synoviae* in njenih membran, skupaj z izolirano DNA celic CEC-32 v dveh pufrih z različno ionsko sestavo. Inkubacija je potekala v pufru 1, ki je vseboval 10 mM MgCl_2 , in pufru 2, ki je vseboval 5 mM MgCl_2 skupaj z 5 mM CaCl_2 . Iz rezultatov poskusa je razvidno, da se vpliv pufov z različno ionsko sestavo pri *M. synoviae* in njenih membranah močno pozna (slika 3). Nukleazna aktivnost je ob prisotnosti Mg^{2+} ionov prisotna, vendar je ob prisotnosti Ca^{2+} ionov razgradnja DNA bistveno hitrejša in fragmentacija intenzivnejša. Tudi membranske frakcije *M. synoviae* so imele po 2 urah inkubacije močnejšo nukleazno aktivnost v prisotnosti Ca^{2+} ionov kot v prisotnosti Mg^{2+} ionov (slika 3, stezi vzorcev 6 in 11).

4.1.2 Nukleazna aktivnost *M. agalactiae*, *M. canis* in *M. cynos*

V drugem poskusu preverjanja nukleazne aktivnosti na izolirani DNA smo ugotavljali nukleazno aktivnost *M. agalactiae*, *M. canis* in *M. cynos* in primerjali vpliv pufru 1 in pufru 2, pri 2 urni inkubaciji. Nukleazno aktivnost njihovih membran smo preverjali le v pufru 2, pri 2 urni inkubaciji. Mikoplazme in membrane v pufru 1 in pufru 2 smo inkubirali skupaj z DNA celic CEC-32.

Na sliki 4 lahko vidimo fragmentirane vzorce DNA celic CEC-32, ki so nastali kot posledica nukleazne aktivnosti *M. agalactiae* (MA), *M. canis* (MCA) in *M. cynos* (MCy) v pufru 1 (steze vzorcev 2-4) in pufru 2 (steze vzorcev 5-7) ter njihovih membran (MA_{mem} , MCA_{mem} in MCy_{mem}) v pufru 2 (steze vzorcev 8-10). Preverjali smo vpliv pufru 1 in pufru 2 na fragmentacijo DNA in primerjali nukleazno aktivnost posameznih vrst mikoplazem med seboj. Fragmente DNA smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo.

S poskusom smo dokazali, da imajo vse tri mikoplazemske vrste nukleazno aktivnost in torej sintetizirajo funkcionalne nukleaze. Nukleazno aktivnost mikoplazem smo primerjali med seboj glede na intenziteto fragmentirane DNA v vzorcih v primerjavi z negativno kontrolo. Najmočnejšo nukleazno aktivnost v pufru 1 je imela *M. cynos*. Nekoliko manjšo nukleazno aktivnost sta pokazali *M. agalactiae* in *M. canis*. V pufru 2 je imela najmočnejšo nukleazno aktivnost *M. cynos*, najšibkejšo pa *M. agalactiae*.



Legenda:

1– DNA molekularni označevalec (M) (Fermentas, SM0333).

2– DNA, inkubirana z MA v pufru 1, pri 2 h inkubaciji.

3– DNA, inkubirana z MCA v pufru 1, pri 2 h inkubaciji.

4– DNA, inkubirana z MCy v pufru 1, pri 2 h inkubaciji.

5– DNA, inkubirana z MA v pufru 2, pri 2 h inkubaciji.

6– DNA, inkubirana z MCA v pufru 2, pri 2 h inkubaciji.

7– DNA, inkubirana z MCy v pufru 2, pri 2 h inkubaciji.

8– DNA, inkubirana z MA_{mem} v pufru 2, pri 2 h inkubaciji.

9– DNA, inkubirana z MCA_{mem} v pufru 2, pri 2 h inkubaciji.

10– DNA, inkubirana z MCy_{mem} v pufru 2, pri 2 h inkubaciji.

11– Negativna kontrola (DNA in pufer).

12– Pozitivna kontrola (DNA inkubirana z DNazoI (Fermentas, EN0521)).

Slika 4: Analiza nukleazne aktivnosti *M. agalactiae* (MA), *M. canis* (MCA) in *M. cynos* (MCy) ter njihovih membran (MA_{mem}, MCA_{mem} in MCy_{mem}) v pufru 1 (10 mM MgCl₂) in pufru 2 (5 mM MgCl₂ in 5 mM CaCl₂) po 2 urni inkubaciji. Substrat je bila DNA izolirana iz celic CEC-32. DNA smo barvali z barvilom SYBR Safe (Invitrogen, S33102) in jo analizirali v 1,8 % agaroznem gelu. Gel smo slikali v UV-transiluminatorju (SYNGENE, U:Genius). Na sliki so označene dolžine fragmentov molekularnega označevalca (od 100 do 400 bp).

Nukleazno aktivnost smo dokazali pri membranah vseh treh vrst mikoplazem. Membrane testiranih mikoplazem so imele močnejšo nukleazno aktivnost kot njihove celice, kar je razvidno na sliki 4. Različne stopnje fragmentacije DNA v pufru 2 so vidne, če primerjamo fragmentacijo, ki so jo povzročile mikoplazemske celice (steze vzorcev 5-7) ali membrane (steze vzorcev 8-10). Z dobljenimi rezultati smo dokazali, da so nukleaze testiranih vrst mikoplazem vezane na celično membrano mikoplazemskih celic oziroma so njen sestavni del. Najmočnejšo nukleazno aktivnost v pufru 2 so imele membrane *M. cynos*, najšibkejšo pa membrane *M. canis*.

4.1.2.1 Vpliv Ca^{2+} in Mg^{2+} na nukleazno aktivnost *M. agalactiae*, *M. canis* in *M. cynos*

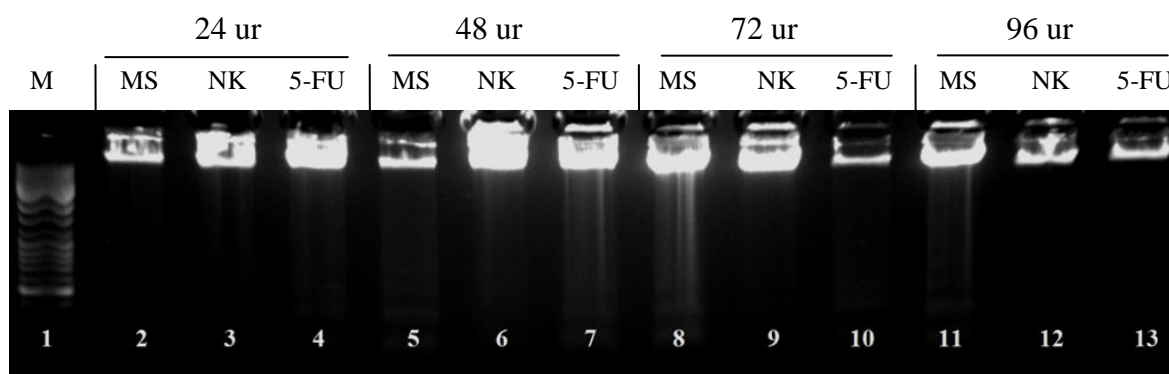
Vpliv Ca^{2+} in Mg^{2+} ionov na nukleaze in posledično na nukleazno aktivnost smo preverjali z inkubacijo izbranih mikoplazem in njihovih membranskih frakcij skupaj z izolirano DNA iz celic CEC-32, v dveh pufrih z različno ionsko sestavo. Dvourni inkubacija je potekala v pufri 1, ki je vseboval 10 mM MgCl_2 , in pufri 2, ki je vseboval 5 mM MgCl_2 skupaj z 5 mM CaCl_2 .

Iz rezultatov je razvidno, da je nukleazna aktivnost ob prisotnosti Mg^{2+} ionov prisotna pri vseh treh mikoplazemskih vrstah, vendar je ob prisotnosti Ca^{2+} ionov razgradnja DNA hitrejša pri *M. canis* in *M. cynos*. Izjema je *M. agalactiae*, ki je ob prisotnosti Ca^{2+} ionov slabše razgradila DNA oziroma je imela šibkejšo nukleazno aktivnost v primerjavi z inkubacijo ob prisotnosti Mg^{2+} ionov.

4.2 PREVERJANJE NUKLEAZNE AKTIVNOSTI *M. synoviae* NA NATIVNI DNA *in situ*

4.2.1 Vpliv *M. synoviae* na razgradnjo native DNA celic CEC-32

Pri poskusu smo preverjali, ali nukleazna aktivnost *M. synoviae* vpliva na razgradnjo DNA gostiteljskih celic po tem, ko bakterija okuži in prodre v žive celice. Poleg celic CEC-32, ki smo jih okužili z *M. synoviae*, smo si pripravili še neokužene celice, ki so nam služile kot negativna kontrola (NK), in celice, v katerih smo umetno sprožili apoptozo s 5-fluorouracilom (5-FU). Te so nam služile kot pozitivna kontrola. DNA iz okuženih celic ter celic negativne in pozitivne kontrole smo izolirali 24, 48, 72 in 96 ur po okužbi in preverjali njeno razgradnjo. Na sliki 5 lahko vidimo analizo razgradnje vzorcev DNA, ki smo jih izolirali iz celic CEC-32 po 24, 48, 72 in 96 urni okužbi z *M. synoviae* (MS), v primerjavi s kontrolnimi vzorci. Vzorce DNA iz okuženih celic CEC-32 in kontrol smo analizirali z elektroforezo v agaroznem gelu.



Legenda:

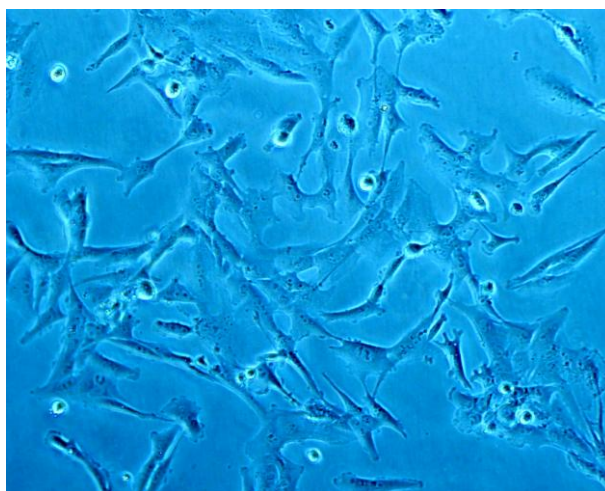
- 1– DNA molekularni označevalec (M) (Fermentas, SM0333).
- 2– DNA celic CEC-32 po okužbi z MS, po 24 urni inkubaciji.
- 3– DNA celic CEC-32 po 24 urni inkubaciji (negativna kontrola).
- 4– DNA celic CEC-32 po apliciranju 5-FU po 24 urni inkubaciji (pozitivna kontrola).
- 5– DNA celic CEC-32 po okužbi z MS, po 48 urni inkubaciji.
- 6– DNA celic CEC-32 po 48 urni inkubaciji (negativna kontrola).
- 7– DNA celic CEC-32 po apliciranju 5-FU po 48 urni inkubaciji (pozitivna kontrola).
- 8– DNA celic CEC-32 po okužbi z MS, po 72 urni inkubaciji.
- 9– DNA celic CEC-32 po 72 urni inkubaciji (negativna kontrola).
- 10– DNA celic CEC-32 po apliciranju 5-FU po 72 urni inkubaciji (pozitivna kontrola).
- 11– DNA celic CEC-32 po okužbi z MS, po 96 urni inkubaciji.
- 12– DNA celic CEC-32 po 96 urni inkubaciji (negativna kontrola).
- 13– DNA celic CEC-32 po apliciranju 5-FU po 96 urni inkubaciji (pozitivna kontrola).

Slika 5: Analiza razgradnje DNA v živih celicah CEC-32. DNA smo izolirali iz celic okuženih z *M. synoviae* (MS) ter iz celic pozitivne (5-FU) in negativne kontrole (NK) od 24 do 96 ur po okužbi oziroma začetku inkubacije. Genomsko DNA smo barvali z etidijevim bromidom (Sigma-Aldrich, Nemčija) in jo analizirali v 1,2 % agaroznem gelu. Gel smo slikali v UV-transiluminatorju (SYNGENE, U:Genius).

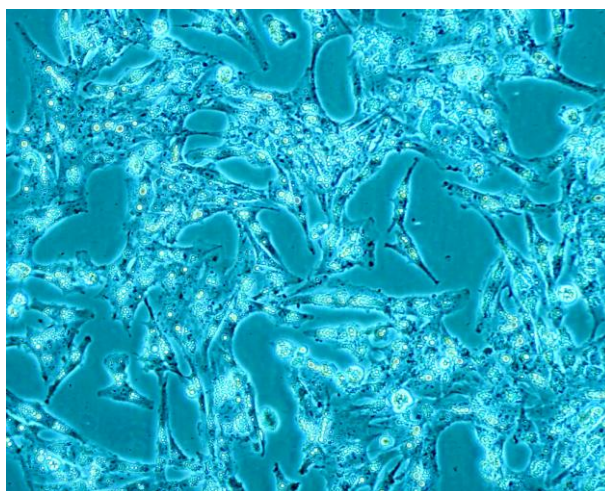
Nukleazne aktivnosti bakterije *M. synoviae* na DNA *in situ*, po vstopu v žive celice CEC-32 nismo mogli potrditi saj so rezultati neskladni glede na trajanje okužbe. Iz rezultatov je razvidno, da je razgradnja DNA pri vzorcih okuženih celic močnejša kot pri negativnih kontrolah pri vseh časih inkubacije, z izjemo 96 urne inkubacije, kjer je lisa DNA negativne kontrole nekoliko debelejša. Razgradnja DNA celic, ki so bile izpostavljene 5-FU je v primerjavi z DNA negativnih kontroli pri vseh časih močnejša oziroma je ostanek native DNA manjši. Po 24 in 48 urni inkubaciji je bila razgradnja DNA pri okuženih celicah močnejša, pri 72 in 96 urni inkubaciji pa manjša, v primerjavi s pozitivno kontrolo. Kljub temu, da je razgradnja DNA 24 in 48 ur po okužbi opazna, ne moremo zagotovo trditi, da nukleaze *M. synoviae* pripomorejo k povečani fragmentaciji native DNA celic CEC-32. K temu pripomore tudi dejstvo, da fragmentacija DNA pri okuženih vzorcih ne narašča s časom inkubacije. S časom inkubacije opazno narašča le fragmentacija pri pozitivnih kontrolah.

4.2.2 Morfološke spremembe na celicah CEC-32 po okužbi z bakterijo *Mycoplasma synoviae*

Po okužbi celic CEC-32 z *M. synoviae*, nas je zanimalo, kakšen vpliv ima mikoplazemska okužba na morfologijo okuženih celic. Na slikah 6 in 7 lahko vidimo morfološke spremembe na celicah CEC-32 po 24 urni inkubaciji z *M. synoviae*, v primerjavi z negativno kontrolo. Pri okuženih celicah so v citoplazmi vidne številne vakuole, ki so lahko nastale kot posledica razgradnje notranjih celičnih elementov in struktur zaradi okužbe celic z *M. synoviae*.



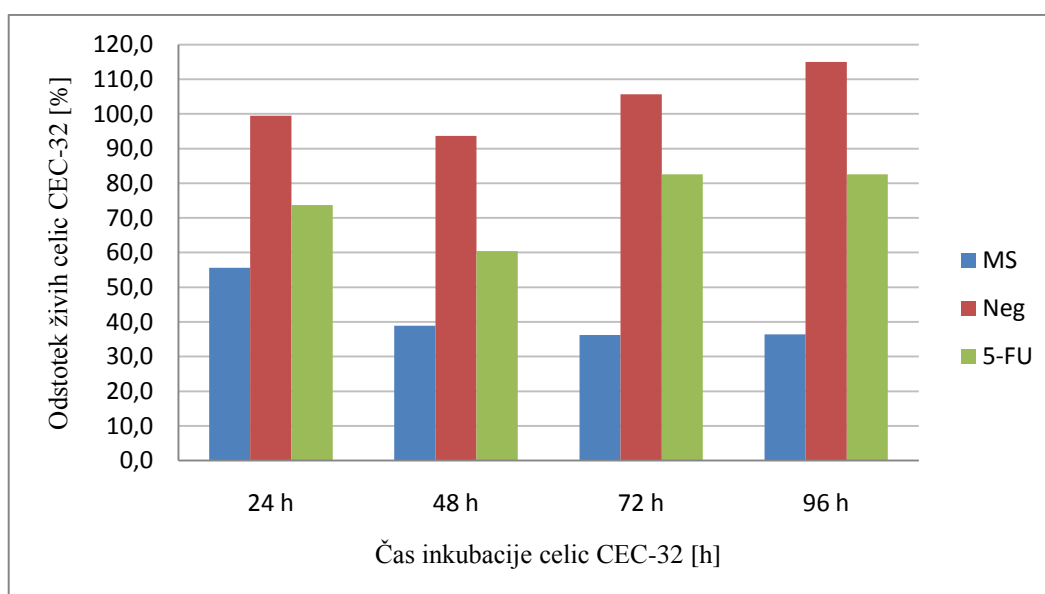
Slika 6: Neokužene celice CEC-32, slikane po 24 urni inkubaciji, pri 200× povečavi (negativna kontrola).



Slika 7: Celice CEC-32, slikane 24 ur po okužbi z *M. synoviae*, pri 200× povečavi.

4.2.3 Viabilnost celic CEC-32 po okužbi z *M. synoviae*

Celicam CEC-32 smo določali viabilnost s testom XTT (Sigma-Aldrich, In Vitro Toxicology Assay Kit, XTT based, TOX2) po 24, 48, 72 in 96 urni inkubaciji. Viabilnost smo določali celicam, ki smo jih predhodno okužili z *M. synoviae*, neokuženim celicam, ki so nam služile kot negativna kontrola, in celicam, v katerih smo inducirali apoptozo s 5-FU. Zadnje so nam služile kot pozitivna kontrola. Zanimalo nas je, kako se število živih oziroma mrtvih celic CEC-32 spreminja s časom inkubacije z *M. synoviae*, v primerjavi s kontrolami.



Slika 8: Odvisnost preživetja celic CEC-32 od trajanja okužbe z *M. synoviae* ter pri pozitivni in negativni kontroli.

Na sliki 8 je prikazan odstotek živih celic CEC-32 (določen s testom XTT) po okužbi z *M. synoviae* ter pri negativni in pozitivni kontroli, pri različnih časih inkubacije. Pri okuženih celicah je že po 24 urah viden padec v viabilnosti, saj je preživel le 55 % celic CEC-32. Še manj preživelih celic je bilo po 48 urah, ker je odstotek živih celic manjši kot 40 %. Po 72 in 96 urah inkubacije ostaja odstotek preživelih celic podoben kot po 48 urni okužbi. Odstotek živih celic pri negativni kontroli rahlo naraste nad 100 % kar je verjetno posledica previsoke koncentracije celic, ki so se tekom inkubacije namnožile in prerasle celotno površino lukenj gojitvenih plošč (do 100 % stopnje preraščenosti in še nadalje preraščale v več slojih). Pri pozitivni kontroli odstotek živih celic po 48 urah pade pod 60 % in nato naraste nad 80 %.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Nukleazno aktivnost smo določali štirim vrstam rodu *Mycoplasma*: *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma canis*, in *Mycoplasma cynos*. Poskus smo razdelili na dva dela. V prvem delu smo testirali nukleazno aktivnost na izolirani DNA. Preverjali smo nukleazno aktivnost pri *M. synoviae* ter *M. agalactiae*, *M. canis* in *M. cynos*. V drugem delu smo preverjali, ali *M. synoviae* po vstopu v žive gostiteljske celice z nukleazno aktivnostjo povzroči oziroma vpliva na razgradnjo gostiteljeve nativne DNA, zato smo ta del poskusa opredelili kot poskus določitve delovanja nukleaz *in situ*. V sklopu poskusa *in situ* smo preverjali tudi morfološke spremembe in viabilnost gostiteljevih celic po okužbi z *M. synoviae*.

Ker je *M. synoviae* eden izmed glavnih patogenih mikroorganizmov perutnine in povzročja veliko ekonomsko škodo v perutninski industriji (Kleven, 1997) in ker je bila večina dela pri naših poskusih opravljenega s tipskim sevom *M. synoviae* (WVU 1853), smo se odločili, da kot gostiteljske celice uporabimo celično linijo piščančjih embrionalnih fibroblastov (CEC-32). Celice CEC-32 in tipski sev WVU 1853 so bili uporabljeni že v predhodnih študijah, kjer je bila na njih dokazana invazivnost *M. synoviae* (Dušanić in sod., 2009). Ker je znano, da se *M. synoviae* prenaša skozi valilna jajca (Bradbury, 2005) in tako okužuje embrije, je celična linija CEC-32 primerna za proučevanje patogenega delovanja aviarnih mikoplazem. Znano je, da sta *M. canis* in *M. cynos* patogena mikroorganizma (Chalker, 2005), prav tako kot *M. agalactiae* (Bergonier in Poumarat, 1996). Predvidevali smo, da imajo vse tri vrste nukleazno aktivnost, ki smo jo preverjali na DNA, ki je bila izolirana iz celic CEC-32.

Nukleazno aktivnost mikoplazem smo preverjali na izolirani genomski DNA iz celic CEC-32. Izolirano DNA smo inkubirali z mikoplazemskimi celicami ali mikoplazemskimi membranami, saj smo želeli preveriti, ali so nukleaze vezane na mikoplazemske membrane. Razgradnjo DNA smo analizirali s postopkom elektroforeze na agaroznem gelu. Podobne poskuse pri študijah nukleazne aktivnosti so že opravljali, le da so kot substrat za nukleaze uporabili fagne λ dvoverižne ali enoverižne DNA molekule, RNA molekule, plazmide ali pa celotna izolirana celična jedra (Bendjennat in sod., 1997; Jarvill-Taylor in sod., 1999; Minion in sod., 1993; Paddenberga in sod., 1996; Paddenberga in sod., 1998; Schmidt in sod., 2007; Sokolova in sod., 1998). Znano je, da prisotnost različnih kovinskih dvovalentnih ionov, predvsem magnezija in kalcija, ter nevtralni do šibko bazični pH vplivajo na nukleazno aktivnost mikoplazemskih nukleaz (Minion in sod., 1993; Paddenberga in sod., 1996; Paddenberga in sod., 1998; Schmidt in sod., 2007). Ker nas je zanimalo, kako različna ionska sestava medija vpliva na nukleazno aktivnost bakterij *M. synoviae*, *M. agalactiae*, *M. canis* in *M. cynos* ter njihovih membranskih frakcij, smo pripravili dva pufra, ki sta vsebovala dvovalentne Ca in Mg ione različnih molarnosti, v katerih smo redčili testirane mikoplazemske kulture in njihove membrane. Uporabili smo

pufra z enako sestavo, kot so jih za analizo nukleazne aktivnosti mikoplazem uporabili Minion in sod. (1993). Puffer 1 je vseboval le Mg^{2+} ione (10 mM $MgCl_2$), puffer 2 pa Mg^{2+} in Ca^{2+} ione (5 mM $MgCl_2$ in 5 mM $CaCl_2$). pH obeh pufrov smo umerili na 7,3.

Za dokazovanje nukleazne aktivnosti na izolirani DNA smo uporabili protokola, ki sta bila v principu podobna protokolom, ki so bili že uporabljeni pri študijah nukleazne aktivnosti pri mikoplazmah, vendar smo ju za naš poskus ustrezno optimizirali. Optimizacija pogojev za uspešno izvedbo poskusov se je izkazala za relativno težavno in dolgotrajno. Da smo dosegli optimalne pogoje za izvedbo poskusa, je bilo potrebno izvesti veliko število ponovitev inkubacij, pri katerih smo skušali določiti optimalno koncentracijo mikoplazemskih celic in membran, tako da ni prišlo do popolne ali, po drugi strani, do neučinkovite razgradnje DNA iz celic CEC-32. Optimizirati je bilo potrebno tudi pogoje elektroforeze, s katero smo analizirali vzorce po končanih inkubacijah. Določiti je bilo potrebno optimalen odstotek ločevalnega agaroznega gela, električno napetost in čas elektroforeze.

Nukleazno aktivnost bakterije *M. synoviae* smo ugotavljali v pufri 1 in pufri 2, pri štirih različnih časih inkubacije. Inkubacije z izolirano DNA so trajale 30 min, 1 uro, 2 uri in 4 ure (slika 3). S tem smo želeli preveriti, ali nukleazna aktivnost narašča s trajanjem inkubacije. Nukleazno aktivnost membran *M. synoviae* smo preverjali v obeh pufrih, pri 2 urni inkubaciji (slika 3). Z analiziranjem DNA na agaroznem gelu smo prvi dokazali, da ima *M. synoviae* nukleazno aktivnost, ki smo jo dokazali za celice *M. synoviae* in tudi za njihove membrane. Z dobljenimi rezultati smo dokazali, da *M. synoviae* sintetizira funkcionalne nukleaze in da so te vezane tudi na membrano mikoplazemskih celic. Dokazali smo tudi, da nukleazna aktivnost *M. synoviae* narašča s časom inkubacije, kar je bilo v skladu z našimi pričakovanji, saj so Bendjennat in sod. (1997) prišli do podobnih rezultatov pri analiziranju nukleazne aktivnosti endonukleaze *M. penetrans*. Vpliv pufrov z različno ionsko sestavo se je pri *M. synoviae* in njenih membranah močno izrazil. V prisotnosti samo Mg^{2+} ionov (puffer 1 je vseboval 10 mM $MgCl_2$) je bila nukleazna aktivnost *M. synoviae* in njenih membran opazna, vendar je bila bistveno šibkejša kot v prisotnosti obeh ionov, Ca^{2+} in Mg^{2+} , hkrati (puffer 2 je vseboval 5 mM $MgCl_2$ in 5 mM $CaCl_2$). Podobne rezultate so dobili tudi pri analizah nukleazne aktivnosti drugih mikoplazemskih vrst v prejšnjih študijah, kjer so dokazali, da predvsem prisotnost Ca^{2+} ionov povzroči povečanje aktivacije mikoplazemskih nukleaz in močnejšo fragmentacijo substratne DNA (Minion in sod., 1993).

Nukleazno aktivnost *M. agalactiae*, *M. canis* ter *M. cynos* za izolirano DNA smo ugotavljali v pufrih 1 in 2, pri 2 urni inkubaciji (slika 4). Nukleazno aktivnost njihovih membran smo preverjali le v pufri 2, pri 2 urni inkubaciji (slika 4). Pri tem delu poskusa smo preverjali le, če imajo izbrane mikoplazme nukleazno aktivnost, nismo pa testirali, kakšen vpliv ima čas inkubacije. Ker se je pri preverjanju nukleazne aktivnosti *M. synoviae* izkazalo, da je 2 urna inkubacija z DNA v pufri 2 dala najlepši rezultat na elektroforetskem gelu, smo se odločili, da bomo tudi te tri vrste mikoplazem in njihove

membrane z izolirano DNA inkubirali 2 uri. Membrane smo iz istega razloga inkubirali v puftru 2, kjer smo želeli preveriti le, če so nukleaze vezane na membrano mikoplazemskih celic in ne v katerem puftru imajo močnejšo nukleazno aktivnost. Z dobljenimi rezultati smo dokazali, da *M. agalactiae*, *M. canis* in *M. cynos* sintetizirajo funkcionalne nukleaze in da so te vezane tudi na membrano mikoplazemskih celic. Smo prvi, ki so nukleazno aktivnost določili *M. canis* in *M. cynos*, za kateri se je izkazalo, da imata močno nukleazno aktivnost, kar predstavlja potencialen dejavnik patogenosti. Vpliv pufrov z različno ionsko sestavo se je pri *M. agalactiae*, *M. canis* in *M. cynos* različno poznal. Vse tri mikoplazemske vrste so imele nukleazno aktivnost v puftru 1, vendar sta imeli *M. canis* in *M. cynos* močnejšo nukleazno aktivnost v puftru 2, pri *M. agalactiae* pa je bilo ravno obratno. Dokazali smo, da imajo celice *M. agalactiae* ob prisotnosti Mg^{2+} ionov močnejšo nukleazno aktivnost kot ob prisotnosti Mg^{2+} in Ca^{2+} ionov. Podobno optimalno delovanje ob prisotnosti magnezija kot pri nukleazah *M. agalactiae* so v preteklosti dokazali tudi pri bakteriji *Mycoplasma capricolum* (Minion in sod., 1993). *M. capricolum* je tako kot *M. agalactiae* patogena vrsta mikoplazem, ki okužuje koze in povzroča podobne patološke spremembe (DaMassa in sod., 1992). Pri *M. capricolum* so Ca^{2+} ioni inhibirali nukleazno aktivnost, ki se je ponovno izrazila, ko so mikoplazemske celice inkubirali pri visokih koncentracijah (10 mM) Mg^{2+} ionov (Minion in sod., 1993).

S poskusoma preverjanja nukleazne aktivnosti na izolirani DNA smo uspeli dokazati, da so za nukleazno aktivnost odgovorne predvsem membransko vezane nukleaze. To pa ne izključuje možnosti, da so za nukleazno aktivnost analiziranih mikoplazem odgovorne le te nukleaze. Če bi želeli potrditi hipotezo, da so za nukleazno aktivnost gostiteljeve DNA odgovorne le membransko vezane nukleaze, bi morali analizirati tudi citoplazemsko vsebino. Dejstvo je, da mikoplazme proizvajajo več vrst nukleaz, ki opravljajo različne naloge (Razin in sod., 1998), in obstaja verjetnost, da analizirane mikoplazemske vrste izločajo nekatere od teh encimov oziroma proizvajajo ekstracelularne nukleaze, ki se sproščajo v okolje (Bendjennat in sod., 1999). Na podlagi naših poskusov prav tako nimamo podatkov, ali imajo nukleaze analiziranih mikoplazem endonukleazno ali eksonukleazno aktivnost. Schmidt in sod. (2007) so za analizo endonukleazne aktivnosti kot substrat uporabili plazmidno DNA, za analizo eksonukleazne aktivnosti pa dvoverižno λ fagno DNA, katero so inkubirali skupaj s prečiščeno rekombinantno nukleazo mhp379 iz *Mycoplasma hyopneumoniae*. Ko so na agaroznem gelu po končani elektroforezi analizirali produkte razgradnje plazmidne DNA, so ugotovili, da ima preiskovana nukleaza endonukleazno aktivnost. Eksonukleazno aktivnost so prav tako dokazali z analizo vzorcev na agaroznem gelu, kjer so po razgradnji λ DNA opazili razvlečene lise DNA, ki so nastale kot posledica eksonukleazne aktivnosti. Količina DNA se je s povečevanjem časa inkubacije vidno manjšala. Če rezultate te študije primerjamo z našimi rezultati pri analizi nukleazne aktivnosti *M. synoviae*, lahko pridemo do zaključka, da obstaja verjetnost, da ima *M. synoviae* eksonukleazno aktivnost. Da bi to trditev zagotovo potrdili, bi bilo potrebno izdelati bolj optimiziran protokol, kot smo ga uporabili mi, saj so Schmidt in sod. (2007) pri analizah uporabili prečiščen rekombinantni protein nukleaze in drugačne naprave ter reagente, ki omogočajo bolj natančno analizo nukleazne aktivnosti. Po

podobnem protokolu kot Schmidt in sod. (2007) bi lahko v nadaljnjih raziskavah preverili tudi endonukleazno aktivnost *M. synoviae*, kar pa za zdaj ni bilo načrtovano. Podoben protokol za detekcijo endonukleazne aktivnosti kot Schmidt in sod. (2007) so opravili tudi Sokolova in sod. (1998).

Znano je, da lahko *M. synoviae* invadira nefagocitirajoče kokošje celice, tudi CEC-32, in se v njih razmnožuje (Dušanić in sod., 2009). Zato smo preverjali tudi, ali *M. synoviae* po vstopu v gostiteljske celice z nukleazno aktivnostjo povzroči oziroma pospeši razgradnjo gostiteljeve nativne DNA *in situ*. V sklopu poskusa smo preverjali tudi morfološke spremembe in viabilnost celic CEC-32 po okužbi z *M. synoviae*.

Za okuževanje celic CEC-32 smo uporabili podoben protokol kot Dušanić in sod. (2009), vendar smo ga za naš poskus priredili in ustrezno optimizirali. Pri izolaciji DNA smo imeli sprva težave, saj s kompletom reagentov Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (Invisorb, Nemčija), s katerim smo izolirali genomsko DNA pri poskusih preverjanja nukleazne aktivnosti na izolirani DNA, nismo uspeli izolirati krajših fragmentov, ki so nastali kot posledica razgradnje DNA, saj je ta komplet namenjen izolaciji genomske DNA oziroma daljših DNA fragmentov. Preizkusili smo tudi več klasičnih protokolov, ki temeljijo na izolaciji DNA s fenol-kloroformom, vendar so se vsi izkazali za relativno neučinkovite. V materialih in metodah je opisan eden izmed njih, vendar so si zelo podobni. Na koncu smo DNA iz okuženih celic izolirali s komercialnim kompletom *ApoTarget*TM Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit (Invitrogen) za izolacijo apoptotske DNA in dobili zadovoljive rezultate. Vzorce tako izolirane DNA smo po poskusih preverjanja nukleazne aktivnosti *in situ* ločili na agaroznem gelu s postopkom elektroforeze. Alternativno bi lahko razgradnjo DNA iz celic CEC-32 po okužbi z *M. synoviae* analizirali s kometnim testom, ki se velikokrat uporablja za analizo poškodb genomske DNA (Singh in sod., 1988). Ker pri kometnem testu analiziramo poškodbe DNA na posameznih celicah, bi morali narediti večje število analiz, da bi dobili statistično značilen rezultat.

V predhodnih poskusih so pokazali, da je *M. synoviae* WVU 1853 invadirala celice CEC-32 že v 4 urah po okužbi in je imela signifikantno večjo invazivnost kot drugi sev *M. synoviae* ULB02/T6 oziroma patogeni sev R_{low} *M. gallisepticum*. *M. synoviae* WVU 1853 je preživela v celicah CEC-32 vsaj 48 ur, vendar takrat v 24 urah po okužbi, niso ugotovili zamiranja celic (Dušanić in sod., 2009). Ugotovili smo, da je viabilnost celic CEC-32 padla na 55 odstotkov že 24 ur po okužbi z *M. synoviae* (slika 8). V 48 urah po okužbi je viabilnost padla pod 40 odstotkov, nato pa se ni več očitno zniževala. Z analizo razgradnje DNA v agaroznem gelu smo ugotovili, da nukleazne aktivnosti *M. synoviae* na nativni DNA v živih celicah CEC-32 na podlagi naših rezultatov ne moremo potrditi. Kljub temu, da je razgradnja DNA opazna, ne moremo zagotovo trditi, da so nukleaze *M. synoviae* tiste, ki so povzročile fragmentacijo nativne DNA celic CEC-32. K temu pripomore tudi dejstvo, da fragmentacija DNA pri okuženih vzorcih ne narašča s časom inkubacije. Če so poleg nukleazne aktivnosti *M. synoviae* prisotni še drugi, do sedaj neznan dejavniki, ki bi ob okužbi lahko povzročili razgradnjo DNA, bodo za ugotavljanje le-teh potrebne

nadaljnje raziskave. Prav tako ni znano, ali na razgradnjo native DNA vplivajo celice *M. synoviae*, ki so po invazivnosti prešle v celice CEC-32, ali tudi tiste celice *M. synoviae*, ki so pritrjene na zunanji strani in jih je več, kot tistih v celicah CEC-32.

S podaljševanjem časa inkubacije opazno narašča le fragmentacija pri pozitivnih kontrolah (prisotnost 5-FU), kar smo pričakovali, saj je razgradnja DNA ena izmed posledic apoptoze (Oberhammer in sod., 1993). Rezultati analize razgradnje DNA pri pozitivnih kontrolah pa ne sovpadajo z rezultati merjenja viabilnosti celic CEC-32. Iz slike 8 je razvidno, da v prisotnosti 5-FU viabilnost po 48 urah pade na 60 odstotkov, nato naraste nad 80 odstotkov, vendar ostaja enaka 72 in 96 ur po začetku inkubacije. Vzrok za zvišan odstotek živih celic bi lahko bilo pomanjkanje 5-FU in istočasno tudi hitrejše pomnoževanje celic CEC-32. Verjetno so po 48 urah celice, ki so kasneje odmrle, porabile večino 5-FU, ki ga je v mediju posledično zmanjkalo, in celice so se lahko ponovno namnožile. Poleg 5-FU bi lahko v našem poskusu pri pozitivni kontroli uporabili še druga sredstva za povzročitev apoptoze, ki bi hitreje povzročila propadanje celic in posledično pospešila razgradnjo DNA, saj 5-FU ni deloval v skladu z našimi pričakovanji. Možno pa je, da bi morali uporabiti večjo koncentracijo 5-FU od predpisane.

Lise, ki predstavljajo nerazgrajeno DNA pri negativnih kontrolah (slika 5), s časom inkubacije ne ostajajo enako debele, ampak se tanjšajo. To nakazuje povečano razgradnjo DNA, ki bi bila lahko posledica apoptotske razgradnje DNA, saj so bile celice po 72 in 96 urah inkubacije ob izolaciji DNA v relativno visoki stopnji preraščenosti. Ta namigovanja sovpadajo z rezultati merjenja viabilnosti (slika 8), saj odstotek viabilnih celic pri negativni kontroli po 72 urah inkubacije naraste nad 100 odstotkov, kar je verjetno posledica previsoke koncentracije celic. Viabilnost celic smo računali glede na njihovo izhodiščno število, ki je bilo 3×10^5 živih celic na posamezni vzorec. Verjetno so se celice tekom inkubacije namnožile, prerasle celotno površino gojitvenih lukenj (do 100 odstotne stopnje preraščenosti in še preraščale v več slojih) in presegle svoje izhodiščno število. Ker je bilo končno število živih celic višje od izhodiščnega, je viabilnost pri negativnih kontrolah po 72 urah višja od 100 odstotkov.

Zanimivo je opažanje, da se lisa DNA v gelu pri vzorcih vzeti 24 in 48 ur po okužbi z *M. synoviae* vidno zmanjša (slika 5), kar se ujema s padcem viabilnosti celic CEC-32, ki pade iz 55 na 39 odstotkov (slika 8). To nakazuje na to, da je razgradnja DNA povezana z viabilnostjo celic CEC-32. Lisi na gelu 72 in 96 ur po okužbi ostajata enako debeli (slika 5), viabilnost celic pa pri istih časih inkubacije ostaja enaka in znaša 37 odstotkov (slika 8). Pričakovali bi, da se viabilnost celic CEC-32 tekom okužbe še naprej manjša. Na podlagi teh rezultatov se poraja vprašanje, ali okužba z *M. synoviae* po 72 urah pripomore k ohranjanju viabilnosti celic CEC-32 na enakem nivoju, čeprav zelo nizkem, in ali ima morda daljša okužba z *M. synoviae* (72 do 96 ur) nekakšen anti-apoptozni učinek. Ker so mikoplazme obvezni paraziti in močno odvisne od svojih gostiteljev (Rottem, 2003), bi s propadom gostitelja propadle tudi same, zato jim je v interesu, da gostitelj preživi. Gerlic in sod. (2004) so ugotovili, da živa *M. fermentas* po okužbi človeške celične linije U937

inhibira apoptozo, povezano z izločanjem TNF- α . Predvidevajo, da *M. fermentas* po pritrditvi na membrano celic U937 ovira vezavo TNF- α na receptor TNFR1 in posledično prepreči aktivacijo kaspaze-3 ali sprostitvev citokroma c iz mitohondrijev, kar prepreči apoptozo (Gerlic in sod., 2004). Morebitni anti-apoptozni učinek *M. synoviae* bi bilo potrebno še potrditi z nadaljnjimi poskusi.

Naš poskus preverjanja nukleazne aktivnosti na nativni DNA v celicah smo zastavili podobno kot v nekaterih predhodnih študijah, vendar smo ga optimizirali do te mere, da so ostale skupne le nekatere izmed uporabljenih metod. Pri tovrstnih študijah je težavna predvsem ponovljivost poskusov, saj so rezultati odvisni od velikega števila dejavnikov in poskusnih pogojev, ki se med laboratoriji razlikujejo, potrebno pa je zelo veliko optimizacije. Sokolova in sod. (1998) so zasledili razgradnjo DNA po okužbi celične linije 2B4 z *M. bovis*, ki je oslabila odpornost celic. Po okužbi so na celice aplicirali različne apoptotske dejavnike. Ti so pri celicah povzročili apoptozo in tudi fragmentacijo genomske DNA, saj so celice zaradi okužbe postale bolj občutljive in so hitreje prešle v stanje apoptoze. Dokazali so tudi, da je povečana apoptoza posledica okužbe z *M. bovis* in povišanega izražanja njenih nukleaz. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Paddenberg in sod. (1996). Pri neki drugi študiji je 24 ur po okužbi z *M. pneumoniae* viabilnost človeških celic A549 padla na 70 odstotkov (Sun in sod., 2008). Citotoksično delovanje endonukleaze P40 *M. penetrans* so dokazali Bendjennat in sod. (1998). Dokazali so, da 10^7 M endonukleaze v osmih urah povzroči padec viabilnosti celic CEM iz 100 na 19 odstotkov, 10^9 M proteina P40 pa je po 72 urah povzročilo padec viabilnosti na 60 odstotkov. Protein P40 je imel tudi očitni vpliv na morfološke spremembe celic CEM, ki so kazale tipične znake apoptoze, kot so kondenzacija citoplazme in nastanek apoptotskih telesc.

V sklopu poskusa preverjanja razgradnje DNA v celicah *in situ* smo dokazali tudi, da ima okužba celic CEC-32 z *M. synoviae* (slika 6) po 24 urah viden vpliv na morfologijo v primerjavi z negativno kontrolo (slika 7). Pri okuženih celicah so v citoplazmi vidne številne vakuole, kar nakazuje na to, da je okužba z *M. synoviae* na celicah povzročila apoptozi podobne znake. Nastale vakuole so lahko posledica delovanja številnih dejavnikov ob okužbi. Lahko so nastale kot posledica sproščanja peroksida, kot so dokazali pri *M. penetrans* (Borovsky in sod., 1998). Za *M. pneumoniae* je bilo dokazano, da se ob okužbi v gostiteljskih celicah izloča velika količina kisikovih radikalov (ROS), ki vplivajo na morfologijo ter viabilnost celic in tudi na fragmentacijo DNA (Sun in sod., 2008). Lahko pa so nastale kot posledica delovanja različnih encimov, kot so proteaze, hemolizin, nevraminidaze (Brown in sod., 2004), ali pa kot kombinacija vseh teh in katerih drugih, še neznanih dejavnikov. Dokazano je, da ima *M. synoviae* proteolitične encime in nevraminidazno aktivnost (Berčič in sod., 2008). Cisteinska proteaza CysP, ki cepi kokošje proteine (Benčina in Berčič, 2007), bi lahko povzročala proteolizo v celicah, kar pa še ni dokazano. Ali je nukleazna aktivnost *M. synoviae* prispevala k nastanku vakuol, na podlagi naših poskusov ne moremo vedeti, je pa možno. Analizo vpliva okužbe *M. synoviae* na piščančje embrionalne celice je leta 1975 opravil Aldridge. Okužene celice so bile v

zgodnji fazi okužbe rahlo vakuolizirane in granularizirane. Pet dni po okužbi je bila citoplazma celic popolnoma degenerirana, prisotne pa so bile tudi poškodbe na celičnih jedrih. Celice *M. synoviae* so bile pritrjene na celične membrane piščančjih celic, kjer so se razmnoževale in tvorile kolonije (Aldridge, 1975). Podobno študijo so opravili Walker in sod. (1978), ki so z *M. synoviae* okužili 10 dni stare piščance. Po treh tednih so v citoplazmi izoliranega adipocitnega tkiva opazili vakuole, ki so vsebovale celice *M. synoviae*. Sinovialne celice, katerih število je bilo povečano, so vsebovale velike količine granularnega endoplazemskega retikuluma in lipidnih telesc. Lipidna telesa so opazili tudi v celicah rahlega vezivnega tkiva in fibroblastih, ki so bili povečani (Walker in sod., 1978). Nedavno je bila opravljena študija, kjer so analizirali citotoksično nukleazo Mpn133 iz *M. pneumoniae*. Mpn133 po modifikaciji, kjer so ji odstranili EKS regijo (E - glutaminska kislina, K - lizin, S - serin), ni bila zmožna vezave in vstopa v celice, imela pa je encimsko aktivnost. EKS regija naj bi imela pomembno vlogo pri vstopu in vezavi na celična jedra. To domnevo so še dodatno okrepili, ko so na EKS regijo konjugirano s proteinom mCherry, v človeških celicah A549 inducirali celično smrt, podobno apoptozi (Somarajan in sod., 2010).

Nukleaze so za mikoplazme pomembne predvsem z vidika pridobivanja nukleotidnih prekurzorjev (Minion in sod., 1993). Pri *M. hyopneumoniae* so našli gen, ki kodira aktivno nukleazo mhp379 in se nahaja znotraj ABC transportnega operona (Schmidt in sod., 2007). To nakazuje na to, da je protein mhp379 s svojo aktivnostjo povezan z delovanjem ABC transportnega sistema pri vnosu prekurzorjev za sintezo nukleinskih kislin v mikoplazemske celice. ABC transportni operon je očitno dokaj ohranjen znotraj rodu *Mycoplasma*, saj so njegove homologne sekvence našli pri več vrstah mikoplazem (Schmidt in sod., 2007). Zanimivo je, da se homologni gen za mhp379 pri *M. synoviae* ne nahaja v neposredni bližini homolognega ABC transportnega operona (Schmidt in sod., 2007). Dokazano je bilo, da genom *M. synoviae* vsebuje številne transpozicijske elemente (Loreto in sod., 2007; Vasconcelos in sod., 2005). Pred genom za nukleazo MS0284 v *M. synoviae*, ki je homologna proteinu mhp379 *M. hyopneumoniae*, so našli gen MS0283 za encim transpozazo, ki je predstavila nukleazo MS0284 iz ABC transportnega operona (Vasconcelos in sod., 2005). Čeprav ni dokazov, da je transpozaza aktivna, se je transpozicija verjetno zgodila že v času evolucije genoma *M. synoviae*. Druga takšna transpozaza, ki je homologna MS0283, je locirana pred genom za cisteinsko proteinazo MS0590, ki je aktivna in cepi kokoške proteine, vključno z IgG oziroma IgY (Benčina, 2010).

Različne lastnosti mikoplazemskih nukleaz in pogoji, ki so potrebni za njihovo optimalno delovanje, kot so molekulska masa, izoelektrična točka, optimalen pH in prisotnost različnih kovinskih dvovalentnih ionov, so v veliki meri posledica neohranjenih zaporedij, ki določajo nukleaze znotraj rodu *Mycoplasma* (Bendjennat in sod., 1997; Jarvill-Taylor in sod., 1999). Ker je bilo do leta 2010 določenih že 16 genomov mikoplazem (Calderon-Copete in sod., 2009; Dybvig in sod., 2008; Nouvel in sod., 2010; Sirand-Pugnet in sod., 2007a), nam to omogoča dober vpogled v razporejenost in zaporedje genov za nukleaze, ki

jih najdemo v raznih podatkovnih zbirkah na spletu. Ohranjenost genov med mikoplazemskimi vrstami lahko glede na zaporedja v genomih dobro ocenimo s poravnavo zaporedij preko strežnikov v podatkovnih zbirkah. V prilogi A so predstavljene primerjave ohranjenosti aminokislin pri homolognih proteinskih zaporedjih za nukleaze tipa mhp379. Primerjavo zaporedij smo opravili s programom BLASTp, kjer smo zaporedje nukleaze MAG_5040 bakterije *M. agalactiae* primerjali z zaporedji nukleaz ostalih vrst mikoplazem. Nukleaza MAG_5040 je verjetno udeležena pri cepitvi DNA, ki smo jo ugotovili tudi v tej nalogi. Nukleaza MS0284 *M. synoviae* ima enake aminokislinske motive kot nukleaze tipa mhp379, vendar je v N-terminalnem delu daljša kot njeni homologi pri drugih vrstah mikoplazem. Homologna je nukleazi tipa SNe iz bakterije *Staphylococcus aureus*, ki ima značilna kratka zaporedja aminokislin (Schmidt in sod., 2007). *M. synoviae* ima še en gen za nukleazo, MS0110, ki pa kodira krajšo nukleazo. Če primerjamo ohranjenost aminokislin med posameznimi nukleazami (priloga A), lahko vidimo, da je med vrstami ohranjenih relativno malo aminokislin (med 25 in 40 odstotkov). Te aminokisliline se verjetno nahajajo v aktivnih mestih nukleaz.

Z našimi poskusi smo prišli do nekaterih novih ugotovitev o nukleazni aktivnosti predstavnikov rodu *Mycoplasma*. Prvi smo dokazali nukleazno aktivnost pri *M. synoviae*, *M. canis* in *M. cynos*. Dokazali smo nukleazno aktivnost membranam *M. synoviae*, *M. agalactiae*, *M. canis* in *M. cynos*, na podlagi česar lahko sklepamo, da so nukleaze teh mikoplazem vezane tudi na njihove membrane. Ugotovili smo, da razgradnja izolirane DNA celic CEC-32 narašča s časom inkubacije z *M. synoviae* in da imata *M. canis* in *M. cynos* močno nukleazno aktivnost. Če so bili poleg magnezijevih ionov prisotni tudi kalcijevi ioni, je bila nukleazna aktivnost *M. synoviae*, *M. canis* in *M. cynos* močnejša, nukleazno aktivnost *M. agalactiae* pa je prisotnost kalcijevih ionov znižala. Po okužbi z *M. synoviae* je bila opažena razgradnja genomske DNA celic CEC-32, vendar nismo dokazali, da so to razgradnjo povzročile samo mikoplazemske nukleaze. Okužba z *M. synoviae* je po 24 urah povzročila vakuolizacijo citoplazme v okuženih celicah. Viabilnost celic CEC-32 je po okužbi z *M. synoviae* po 24 urah padla na 55 odstotkov in po 48 urah na 39 odstotkov, nato pa se tekom inkubacije ni bistveno spreminjala.

5.2 SKLEPI

- *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma canis* in *Mycoplasma cynos* imajo nukleazno aktivnost, na podlagi česar lahko sklepamo, da sintetizirajo funkcionalne nukleaze. To so prvi dokazi nukleazne aktivnosti pri *M. synoviae*, *M. canis* in *M. cynos*.
- Membrane *M. synoviae*, *M. agalactiae*, *M. canis* in *M. cynos* imajo nukleazno aktivnost, na podlagi česar lahko sklepamo, da so nukleaze teh mikoplazem vezane tudi na njihove membrane.
- Razgradnja izolirane DNA celic CEC-32 narašča s časom inkubacije z *M. synoviae*.
- Nukleazna aktivnost *M. synoviae*, *M. canis* in *M. cynos* je močnejša, če so poleg magnezijevih ionov prisotni tudi kalcijevi ioni.
- Nukleazna aktivnost *M. agalactiae* je močna ob prisotnosti magnezijevih ionov, prisotnost kalcijevih ionov pa jo zniža.
- Po okužbi z *M. synoviae* je bila opažena razgradnja genomske DNA okuženih celic CEC-32, vendar nismo dokazali, da so to razgradnjo povzročile samo mikoplazemske nukleaze.
- Okužba z *M. synoviae* povzroči morfološke spremembe na okuženih celicah CEC-32 že po 24 urah, ki se kažejo v obliki vakuolizacije citoplazme.
- Viabilnost celic CEC-32 po okužbi z *M. synoviae* po 24 urah pade na 55 odstotkov in po 48 urah na 39 odstotkov, nato pa se ni več zniževala.

6 POVZETEK

Mikoplazme so najmanjši znani organizmi zmožni samostojne rasti in podvojevanja. Edinstvena lastnost mikoplazem je majhen genom in odsotnost celične stene. Mikoplazme so v naravi razširjene kot paraziti ljudi, sesalcev, ptic, plazilcev, rib, členonožcev in rastlin. So gostiteljsko ter tkivno specifične. Pomemben dejavnik pri patogenezi mikoplazem je pritrjevanje na gostiteljske celice. Veliko mikoplazem sintetizira nukleaze. Nukleazna aktivnost naj bi služila kot mehanizem za pridobivanje prekurzorjev za sintezo mikoplazemskih nukleinskih kislin, ki jih same niso zmožne sintetizirati. Pri vseh preiskovanih mikoplazmah so identificirali nukleazno aktivnost, povezano z delovanjem membransko vezanih nukleaz.

Mycoplasma synoviae je eden izmed glavnih patogenih mikroorganizmov kokoši in puranov v perutninski industriji. Povzročča respiratorna obolenja in poškodbe sklepov. Faktorji patogenosti *M. synoviae* niso pojasnjeni, vključujejo pa sposobnost hemaglutinacije, hemadsorpcije in nevraminidazne aktivnosti. Pri *M. synoviae* je bila dokazana zmožnost invadiranja nefagocitirajočih kokošjih celic v *in vitro* pogojih.

Bakterijo *Mycoplasma canis* so izolirali iz psov z urogenitalnimi obolenji in neplodnostjo, ni pa znano ali je povzročitelj teh bolezni. *M. canis* ni specifična le za enega gostitelja. *M. canis* je bila dokazana močna nevraminidazna aktivnost, povzročča lahko hemaglutinacijo oziroma hemadsorbcijo in ima spremenljivo proteolitično aktivnost.

Mycoplasma cynos je edina mikoplazma, ki je bila pogosto povezana z respiratornimi boleznimi pri psih. Naseljuje mukozne membrane vek, zgornji respiratorni trakt, pljučna tkiva in genitalne organe psov in psic. Dokazano je bilo, da povzročča hemaglutinacijo in ima močno nevraminidazno aktivnost.

Mycoplasma agalactiae spada med glavne patogene vrste mikoplazem, ki okužujejo koze in ovce. Posledice okužbe so mastitis, presušitev vimena, poliartritis, keratokonjunktivitis, pri kronično okuženih živalih pa tudi pljučnica in splavi. Pri *M. agalactiae* je bil opisan imunodominantni protein P40, ki omogoča pritrjevanje na površino celic sinovialnih membran in družina površinskih proteinov Vpma.

Namen dela je bil ugotoviti, ali imajo bakterije *M. synoviae*, *M. canis*, *M. cynos* in *M. agalactiae* nukleazno aktivnost, ali je nukleazna aktivnost vezana na njihove membrane, ali razgradnja DNA s časom inkubacije z *M. synoviae* narašča ter kako na nukleazno aktivnost vplivajo Ca^{2+} in Mg^{2+} ioni. Nukleazno aktivnost mikoplazem in njihovih membran smo preverjali na izolirani genomski DNA iz celic CEC-32, v dveh pufrih z različno ionsko sestavo. Razgrajene vzorce DNA, ki so nastali kot posledica nukleazne aktivnosti, smo analizirali z elektroforezo v agaroznem gelu. Dokazali smo, da imajo *M. synoviae*, *M. canis*, *M. cynos* in *M. agalactiae* nukleazno aktivnost, ki smo jo dokazali tudi njihovim membranam. Razgradnja izolirane DNA celic CEC-32 je naraščala s časom

inkubacije z *M. synoviae*. Nukleazna aktivnost *M. synoviae*, *M. canis* in *M. cynos* bila je močnejša, če so bili poleg magnezijevih ionov, prisotni tudi kalcijevi ioni, nukleazno aktivnost *M. agalactiae* pa je prisotnost kalcijevih ionov znižala. V drugem delu poskusa smo preverjali, ali *M. synoviae* po vstopu v žive celice CEC-32 z nukleazno aktivnostjo vpliva na razgradnjo gostiteljeve nativne DNA. Preverjali smo tudi morfološke spremembe in viabilnost celic CEC-32 po okužbi z *M. synoviae*. Iz živih celic CEC-32, smo po okužbi z *M. synoviae* izolirali DNA in preverili njeno razgradnjo z elektroforezo v agaroznem gelu. Morfološke spremembe smo opazovali in slikali z mikroskopom, viabilnost pa določili s testom XTT. Po okužbi z *M. synoviae* je bila opažena razgradnja genomske DNA celic CEC-32, vendar nismo dokazali, da so to razgradnjo povzročile samo mikoplazemske nukleaze. Okužba z *M. synoviae* je po 24 urah povzročila vakuolizacijo citoplazme v okuženih celicah. Viabilnost celic CEC-32 je po okužbi z *M. synoviae* po 24 urah padla na 55 % in po 48 urah na 39 %, nato pa se tekom inkubacije ni bistveno spreminjala.

Z našimi poskusi smo prišli do nekaterih rezultatov, ki dodatno pripomorejo k razumevanju patogenega delovanja testiranih mikoplazem. Zanimivo bi bilo, če bi v prihodnje razvili postopke, s katerimi bi mikoplazmam določili še endonukleazno oziroma eksonukleazno aktivnost, preverili njihovo specifičnost na različne substrate nukleinskih kislin, preverili ali izločajo nukleaze tudi v okolje in določili nukleazno aktivnost v citoplazemski frakciji.

7 VIRI

- Adams R. P. L., Knowler J. T., Leader D. P. 1992. The biochemistry of the nucleic acids. 11th edition. London, Chapman & Hall: 683 str.
- Aldridge K. E. 1975. Growth and cytopathology of *Mycoplasma synoviae* in chicken embryo cell cultures. *Infection and Immunity*, 12, 1: 198-204
- Almagor M., Kahane I., Gilon C., Yatziv S. 1986. Protective effects of the glutathione redox cycle and vitamin E on cultured fibroblasts infected by *Mycoplasma pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 52, 1: 240-244
- Arends M. J., Morris R. G., Wyllie A. H. 1990. Apoptosis: The role of endonuclease. *American Journal of Pathology*, 136, 3: 593-608
- Armstrong D., Yu B. H., Yagoda A., Kagnoff M. F. 1971. Colonization of humans by *Mycoplasma canis*. *Journal of Infectious Diseases*, 124: 607-609
- Barile M. F., Rottem S. 1993. Mycoplasmas in cell cultures. V: Rapid diagnosis of mycoplasmas. Kahane I., Adoni A. (eds.). New York, Plenum Press: 155-193
- Benčina D. 2002. Hemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Pathology*, 31: 535-547
- Benčina D. 2010. Lokacija gena za transpozazo, ki je homologna transpozazi MS0284 iz bakterije *Mycoplasma synoviae*. Domžale, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, (osebni vir, avgust 2010).
- Benčina D., Berčič R. L. 2007. New insights into the factors associated with pathogenicity and immunogenicity of avian *Mycoplasmas* and their interactions with host cells. V: Proceedings of the 7th Symposium of Poultry Days 2007 with international participation, Poreč, Croatia, 7-10 May, 2007. Croatian Veterinary Institute, Poultry Centre.
- Benčina D., Dorrer D., Tadina T. 1987. *Mycoplasma* species isolated from six avian species. *Avian Pathology*, 16: 653-664
- Benčina D., Tadina T., Dorrer D. 1988a. Natural infection of ducks with *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma* egg transmission. *Avian Pathology*, 17: 441-449
- Benčina D., Tadina T., Dorrer D. 1988b. Natural infection of geese with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*, and egg transmission of mycoplasmas. *Avian Pathology*, 17: 925-928
- Bendjennat M., Blanchard A., Loutfi M., Montagnier L., Bahraoui E. 1997. Purification and characterization of *Mycoplasma penetrans* Ca²⁺/Mg²⁺-dependent endonuclease. *Journal of Bacteriology*, 179, 7: 2210-2220
- Bendjennat M., Blanchard A., Loutfi M., Montagnier L., Bahraoui E. 1999. Role of *Mycoplasma penetrans* endonuclease P40 as a potential pathogenic determinant. *Infection and Immunity*, 67, 9: 4456-4462

- Berčič R. L., Slavec B., Lavrič M., Narat M., Zorman-Rojs O., Dovč P., Benčina D. 2008. A survey of avian *Mycoplasma* species for neuraminidase enzymatic activity. *Veterinary Microbiology*, 130: 391-397
- Bergonier D., Poumarat F. 1996. Contagious agalactia of small ruminants: epidemiology, diagnosis and control. *Revue scientifique et technique*, 16, 3: 848-873
- Borovsky Z., Tarshis M., Zhang P., Rottem S. 1998. Protein kinase C activation and vacuolation in HeLa cells invaded by *Mycoplasma penetrans*. *Journal of Medical Microbiology*, 47, 10: 915-922
- Bove J. M. 1993. Molecular features of mollicutes. *Clinical Infectious Diseases*, 17: S10-S31
- Bowe P. S., Kruiningen H. J., Rosendal S. 1982. Attempts to produce granulomatous colitis in Boxer dogs with mycoplasma. *Canadian Journal of Comperative Medicine*, 46: 430-433
- Bradbury J. M. 2001. Avian mycoplasmas. V: Poultry diseases. Jordan F., Pattison M., Alexander D., Faragher T. (eds.). London, W. B. Saunders: 178-193
- Bradbury J. M. 2005. Poultry mycoplasmas: sophisticated pathogens in simple guise. *British Poultry Science*, 46, 2: 125-136
- Brocchi M., Vasconcelos A. T. R., Zaha A. 2007. Restriction-modification systems in *Mycoplasma* spp. *Genetics and Molecular Biology*, 30, 1: 236-244
- Brown D. R., Zacher L. A., Farmerie W. G. 2004. Spreading factors of *Mycoplasma alligatoris*, a flesh-eating mycoplasma. *Journal of Bacteriology*, 186, 12: 3922-3927
- Cahill J. F., Cole B. C., Wiley B. B., Ward J. R. 1971. Role of biological mimicry in the pathogenesis of rat arthritis induced by *Mycoplasma arthritidis*. *Infection and Immunity*, 3, 1: 24-35
- Calame K., Ghosh S. 1995. Regulation of immunoglobulin gene transcription. V: Immunoglobulin genes. Honjo T., Alt F. W. (eds.). San Diego, Academic Press INC.: 397-423
- Calderon-Copere S. P., Wigger G., Wunderlin C., Schmidheini T., Frey J., Quail M. A., Falquet L. 2009. The *Mycoplasma conjunctivae* genome sequencing, annotation and analysis. *BMC Bioinformatics*, 10, 6: S7
- Carvalho F. M., Fonseca M. M., De Medeiros S. B., Scortecci K. C., Blaha C. A. G., Agnez-Lima L. F. 2005. DNA repair in reduced genome: The Mycoplasma model. *Gene*, 360, 2: 111-119
- Chalker V. J. 2005. Canine mycoplasmas. *Research in Veterinary Science*, 79: 1-8
- Chalker V. J., Brownlie J. 2004. Taxonomy of canine *Mollicutes* by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 54: 537-542

- Chalker V. J., Owen W. M. A., Paterson C., Baker E., Brooks H., Rycroft A. N., Brownlie J. 2004. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. *Microbiology*, 150: 3491-3497
- Citti C., Browning G., Rosengarten R. 2005. Phenotypic diversity and cell invasion in host subversion by pathogenic mycoplasmas. V: *Mycoplasmas: molecular biology, pathogenicity and strategies for control*. Blanchard A., Browning G. (eds.). Norfolk, Horizon Bioscience: 439-484
- Cole B. C., Washburn L. R., Taylor-Robinson D. 1985. Mycoplasma-induced arthritis. V: *The mycoplasmas: mycoplasma pathogenicity*. Razin S., Barile M. F. (eds.). Orlando, Academic Press: 107-160
- Cottew G. S. 1985. Infections with mollicutes in sheep and goats: V: *Infektionen durch Mycoplasmatales*. Gylstorff I. (ed.). Stuttgart, Ferdinand Enke: 368-386
- Cusick M. E., Wassarman P. M., DePamphilis M. L. 1989. Application of nucleases to visualizing chromatin organization at replication forks. *Methods of Enzymology*, 170: 290-316
- Dallo S. F., Chavoya A., Baseman J. B. 1990. Characterization of the gene for a 30-kDa adhesin-related protein of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 58: 4163-4165
- DaMassa A. J., Wakenell P. S., Brooks D. L. 1992. Review article. Mycoplasmas of goat and sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4: 101-113
- de la Fe C., Amores J., Martin A. G., Sanchez A., Contreras A., Corrales J. C. 2009. *Mycoplasma agalactiae* detected in the semen of goat bucks. *Theriogenology*, 72, 9: 1278-1281
- Dirksen L. B., Proft T., Hilbert H., Plagens H., Herrmann R., Krause D. C. 1996. Nucleotide sequence analysis and characterization of the *hmw* gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae*. *Gene*, 171, 1: 19-25
- 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, 1 2: 114-119
- Dybvig K., Sitaraman R., French C. T. 1998. A family of phase-variable restriction enzymes with differing specificities generated by high-frequency gene rearrangements. *The Proceedings of the National academy of Sciences Online*, 95, 23: 13923-13928
- Dybvig K., Zuhua C., Lao P., Jordan D. S., French C. T., Tu A. H., Loraine A. E. 2008. Genome of *Mycoplasma arthritis*. *Infection and Immunity*, 76, 9: 4000-4008
- Edwards D. G., Fitzgerald W. A. 1951. The isolation of organisms of the pleuropneumonia group from dogs. *Journal of General Microbiology*, 5: 566-575

- Fleury B., Bergonier D., Berthelot X., Peterhans E., Frey J., Vilei E. M. 2002. Characterization of P40, a cytoadhesin of *Mycoplasma agalactiae*. *Infection and Immunity*, 70, 10: 5612-5621
- Fraser C. M., Gocayne J. D., White O., Adams M. D., Clayton R. A., Fleischmann R. D., Bult C. J., Kerlavage A. R., Sutton G., Kelley J. M., Fritchman J. L., Weidman J. F., Small K. V., Sandusky M., Fuhrmann J., Nguyen D., Utterback T. R., Saudek D. M., Phillips C. A., Merrick J. M., Tomb J.-F., Dougherty B. A., Bott K. F., Hu P.-C., Lucier T. S., Pettersen S. N., Smith H. O., Hutchison C. A., Venter J. C. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270: 397-403
- Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W. 1995. DNA repair and mutagenesis. Washington DC, American Society for Microbiology: 698 str.
- Friedmann T., Roblin R. 1972. Gene therapy for human genetic disease? *Science*, 175, 4025: 949-955
- Gardella R. S., DelGuidice R. A. 1983. Hemagglutination, hemadsorption and hemolysis. V: *Methods in mycoplasmaology*. 1st ed. Razin S., Tully J. G. (eds.). New York, Academic Press: 225-233
- Garrity G. M., Lilburn T. G., Cole J. R., Harrison S. H., Euzéby J., Tindall B. J. 2007. The Bacteria: Phylum »Firmicutes«: Class *Mollicutes*. *Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea*, 7.7: 317-332
- Gerlic M., Horowitz J., Horowitz S. 2004. *Mycoplasma fermentas* inhibits tumor necrosis factor α -induced apoptosis in the human myelomonocytic U937 cell line. *Cell Death and Differentiation*, 11: 1204-1212
- Gil M. C., Pena F. J., Hermoso De Mendoza J., Gomez L. 2003. Genital lesions in an outbreak of caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma putrefaciens*. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 50, 10: 484-487
- Glew M. D., Papazisi L., Poumarat F., Bergonier D., Rosengarten R., Citti C. 2000. Characterization of multigene family undergoing high-frequency DNA rearrangements and coding for abundant variable surface proteins in *Mycoplasma agalactiae*. *Infection and Immunity*, 68, 8: 4539-4548
- Griffiths A. J. F., Wessler S. R., Lewontin R. C., Gelbart W. M. Suzuki D. T., Miller J. H. 2005. Introduction to genetic analysis. 8th ed. New York, W. H. Freeman and Company: 782 str.
- Hames B. D., Glover D. M. 1996. Molecular immunology. 2nd edition. New York, Oxford University Press: 386 str.
- Hasso S. A., Al-Aubaidi J. M., AL-Darraji A. M. 1993. Contagious agalactia in goats: its severity as related to the route of infection and pregnancy. *Small Ruminant Research*, 10, 3: 263-275

- Himmelreich R., Hilbert H., Plaagens H., Pirkl E., Li B.-C., Herrmann R. 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, 24: 4420-4449
- Inamine J. M., Denny T. P., Loechel S., Schaper U., Huang C. H., Bott K. F., Hu P. C. 1988. Nucleotide sequence of the P1 attachment-protein gene of *Mycoplasma pneumoniae*. *Gene*, 64, 2: 217-229
- Jarvill-Taylor K. J., VanDyk C., Minion F. C. 1999. Cloning of *mnuA*, a membrane nuclease gene of *Mycoplasma pulmonis*, and analysis of its expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181, 6: 1853-1860
- Jensen J. G., Blom J., Lind K. 1993. Intracellular location of *Mycoplasma genitalium* in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy. *International Journal of Pathology*, 75, 2: 91-98
- Johansson K. E., Pettersson B. 2002. Taxonomy of Mollicutes. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Rasin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 1-30
- 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
- Kawakubo Y., Kume K., Yoshioka M. 1981. Effects of thymectomy and bursectomy on the systemic lesions of experimental *Mycoplasma synoviae* infection of the chicken. *Journal of Comparative Pathology*, 91: 143-151
- Kirchhoff H. 1992. Motility. V: Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis. Maniloff J., McElhaney R. N., Finch L. R., Baseman J. B. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology: 289-306
- Kleven S. H. 1997. *Mycoplasma synoviae* infection. V: Diseases of poultry. Calnek B. W., Barnes H. J., Beard C. W., McDougald L. R., Saif Y. M. (eds.). Ames, Iowa State University Press: 220-228
- Kobayashi I., Nobusato A., Kobayashi-Takahashi N., Uchiyama I. 1999. Shaping the genome – restriction – modification systems as mobile genetic elements. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9, 1: 649-656
- Krause D. C. 1996. *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: unravelling the tie that binds. *Molecular Microbiology*, 20, 2: 247-253
- Krause D. C., Leith D. K., Wilson R. M., Baseman J. B. 1982. Identification of *Mycoplasma pneumoniae* protein associated with hemadsorption and virulence. *Infection and Immunity*, 35: 809-817
- L'Abbe-Lund T. M., Heiene R., Friis N. F., Ahrens P., Sorum H. 2003. *Mycoplasma canis* and urogenital disease in dogs in Norway. *Veterinary Record*, 153, 8: 231-235

- Lo S. C. 1992. Mycoplasmas in AIDS. V: Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis. Maniloff J., McElhaney R. N., Finch L. R., Baseman J. B. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology: 525-548
- Lo S. C., Hayes M. M., Kotani H., Pierce P. F., Wear D. J., Newton P. B., Tully J. G., Shih J. W. 1993. Adhesion onto and invasion into mammalian cells by *Mycoplasma penetrans*: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. *Modern Pathology*, 6, 3: 276-280
- Lockaby S. B., Hoerr F. J., Lauerman L. H., Smith B. F., Samoylov A. M., Toivio Kinnucan M. A., Kleven S. H. 1999. Factors associated with virulence of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 43, 2: 251-261
- Loreto E. L. S., Ortiz M. F., Porto J. I. R. 2007. Insertion sequences as variability generators in the *Mycoplasma hyopneumoniae* and *M. synoviae* genomes. *Genetics and Molecular Biology*, 30, 1: 283-289
- Maniloff J. 2002. Phylogeny and Evolution. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Rasin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 31-44
- May M., Brown D. R. 2009. Secreted sialidase activity of canine mycoplasmas. *Veterinary Microbiology*, 137, 3-4: 380-383
- McGarrity G. J., Kotani H., Butler G. H. 1992. Mycoplasmas and tissue culture cell. V: Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis. Maniloff J., McElhaney R. N., Finch L. R., Baseman J. B. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology: 445-454
- Megid R., Nicholas R. A. J., Miles R. J. 2001. Biochemical characterization of *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar* and recent isolates of *Mycoplasma canis*. *Veterinary Research Communications*, 25: 1-12
- Messick J. B., Walker P. G., Raphael W., Berent L., Shi X. 2002. '*Candidatus mycoplasma haemodidelphidis*' sp. nov., '*Candidatus mycoplasma haemolamae*' sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 693-698
- Miles R. J. 1992. Catabolism in mollicutes. *Journal of General Microbiology*, 138: 1773-1783
- Minion F. C., Gougen J. D. 1986. Identification and preliminary characterization of a membrane-bound endonuclease in *Mycoplasma pulmonis*. *Infection and Immunity*, 51: 352-354
- Minion F. C., Jarvill-Taylor K. J., Billings D. E., Tigges E. 1993. Membrane-associated nuclease activities in mycoplasmas. *Journal of Bacteriology*, 175, 24: 7842-7847

- Miyata M., Ryu W. S., Berg H. C. 2002. Force and velocity of *Mycoplasma mobile* gliding. *Journal of Bacteriology*, 184, 7: 1827-1831
- Miyata M., Seto S. 1999. Cell reproduction cycle of mycoplasma. *Biochimie*, 81, 8-9: 873-878
- Miyata M., Uenoyama A. 2002. Movement on the cell surface of the gliding bacterium, *Mycoplasma mobile*, is limited to its head-like structure. *FEMS Microbiology Letters*, 215, 2: 285-289
- 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
- Nicolas M. F., Barcellos F. G., Hess P. N., Hungria M. 2007. ABC transporters in *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma synoviae*: insights into evolution and pathogenicity. *Genetics and Molecular Biology*, 30, 1: 202-211
- Nicholas R. A. J. 2002. Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. *Small Ruminant Research*, 45, 2: 145-149
- Nicholas R. A., Hannam D. A., Baker S. E., Weaver C. R., Laak E. A. 1995. *Mycoplasma canis* in British calf. *Veterinary Record*, 137: 443-444
- Noormohammadi A. H., Markham P. F., Whithear K. G., Walker I. D., Gurevich V. A., Ley D. H., Browning G. F. 1997. *Mycoplasma synoviae* has two distinct phase-variable major membrane antigens, one of which is a putative hemagglutinin. *Infection and Immunity*, 65, 7: 2542-2547
- Noormohammadi A. H., Markham P. F., Duffy M. F., Whithear K. G., Browning G. H. 1998. Multigene families encoding the major hemagglutinins in phylogenetically distinct mycoplasmas. *Infection and Immunity*, 66, 7: 3470-3475
- Nouvel L. X., Sirand-Pugnet P., Marena M. S., Sagne E., Barbe V., Mangenot S., Schenowitz C., Jacob D., Barre A., Claverol S., Blanchard A., Citti C. 2010. Comparative genomic and proteomic analyses of two *Mycoplasma agalactiae* strains: clues to the macro- and micro-events that are shaping mycoplasma diversity. *BMC genomics*, 11, 86
- Oberhammer F., Wilson J. W., Dive C., Morris I. D., Hickman J. A., Wakeling A. E., Walker P. R., Sikorska M. 1993. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *The EMBO Journal*, 12, 9: 3679-3684
- Osawa S., Jukes T. H., Watanabe K., Muto A. 1992. Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiological Reviews*, 56, 1: 229-264
- Paddenberg R., Weber A., Wulf S., Mannherz H. G. 1998. *Mycoplasma* nuclease able to induce internucleosomal DNA degradation in cultured cells possess many characteristics of eukaryotic apoptotic nucleases. *Cell Death and Differentiation*, 5: 517-528

- Paddenberg R., Wulf S., Weber A., Heimann P., Beck L. A., Mannherz H. G. 1996. Internucleosomal DNA fragmentation in cultured cells under conditions reported to induce apoptosis may be caused by mycoplasma endonucleases. *European Journal of Cell Biology*, 71, 1: 105-119
- Pascucci S., Maestrini N., Govoni S., Prati A. 1976. *Mycoplasma synoviae* in the guinea fowl. *Avian Pathology*, 5: 291-297
- Pettersson B., Uhlen M., Johansson K.-E. 1996. Phylogeny of some mycoplasmas from ruminants based on 16S rRNA sequences and definition of a new cluster within the Hominis group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 6: 1093-1098
- Pollack J. D. 2002. The necessity of combining genomic and enzymatic data to infer metabolic function and pathways in the smallest bacteria: amino acid, purine and pyrimidine metabolism in *Mollicutes*. *Frontiers in Bioscience*, 7: 1762-1781
- Pollack J. D., Razin S., Cleverdon R. C. 1965. Localization of enzymes in *Mycoplasma*. *Journal of Bacteriology*, 90: 617-622
- Pollack J. D., Williams M. V., McElhaney R. N. 1997. The comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function. *Critical Reviews in Microbiology*, 23: 269-354
- Poveda J. B., Carranza J., Miranda A., Garrido A., Hermoso M., Fernandez A., Domenech J. 1990. An epizootiological study of avian Mycoplasmas in Southern Spain. *Avian Pathology*, 19: 627-633
- Randolph J. F., Moise N. S., Scarlett J. M., Shin S. J., Blue J. T., Bookbinder P. R. 1993. Prevalence of mycoplasmal and ureaplasma recovery from tracheobronchial lavages and prevalence of mycoplasmal recovery from pharyngeal swab specimens in dogs with or without pulmonary disease. *American Journal of Veterinary Research*, 54: 387-391
- Razin S. 1978. The mycoplasmas. *Microbiological Reviews*, 42, 2: 414-470
- Razin S. 1983. Cell lysis and isolation of membranes. V: Methods in mycoplasmaology. 1st ed. Razin S., Tully J. G. (eds.). New York, Academic Press: 225-233
- Razin S., 1993. Mycoplasma membranes as models in membrane research. *Subcellular Biochemistry*, 20: 1-28
- Razin S., Jacobs E. 1992. Mycoplasma adhesion. *Journal of General Microbiology*, 138: 407-422
- Razin S., Knyszynski A., Lifshitz Y. 1964. Nucleases of Mycoplasma. *Journal of General Microbiology*, 36: 323-331
- Razin S., Oliver O. 1961. Morphogenesis of mycoplasma and bacterial L-form colonies. *Journal of General Microbiology*, 24: 225-237

- Razin S., Yogev D., Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 4: 1094-1156
- Recce R. L., Ireland L., Scott P. C. 1986. Mycoplasmosis in racing pigeons. *Australian Veterinarian Journal*, 63: 166-167
- Rodwell A. W., Whitcomb R. F. 1983b. Method for direct and indirect measurement of mycoplasma growth. V: *Methods in mycoplasmaology*. 1st ed. Razin S., Tully J. G. (eds.). New York, Academic Press: 185-196
- Rosendal S. 1972. Mycoplasmas as a possible cause of enzootic pneumonia in dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 13: 137-139
- Rosendal S. 1973. *Mycoplasma cynos*, a new canine *Mycoplasma* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23, 1: 49-54
- Rosendal S. 1975. Canine mycoplasmas: cultural and biochemical studies of type and reference strains. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology*, 83: 457-462
- Rosendal S. 1982. Canine mycoplasma: their ecologic niche and role in disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 180: 1212-1214
- Rosendal S., Vinther O. 1977. Experimental mycoplasmal pneumonia in dogs: electron microscopy of infected tissue. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology*, 85: 462-465
- Rottem S. 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiological Reviews*, 83: 417-432
- Rottem S., Barile M. F. 1993. Beware of mycoplasmas. *Trends in Biotechnology*, 11, 4: 143-151
- Rottem S., Naot Y. 1998. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. *Trends in Microbiology*, 6, 11: 436-440
- Sasaki Y. 2006. *Mycoplasma*. V: *Bacterial genomes and infectious diseases*. Chan V. L., Sherman P. M., Bourke B. (eds.). New Jersey, Humana Press: 175-190
- Schmidt J. A., Browning G. F., Markham P. F. 2007. *Mycoplasma hyopneumoniae* mhp379 is a Ca²⁺-dependent, sugar-nonspecific exonuclease exposed on the cell surface. *Journal of Bacteriology*, 189, 9: 3414-3424
- Shibata K. I., Sasaki T., Watanabe T. 1995. AIDS-associated mycoplasmas possess phospholipases C in the membrane. *Infection and Immunity*, 63, 10: 4174-4177
- Singh N., Rajya B. S., Mohanty G. C. 1974. Granular vulvovaginitis (GVV) in goats associated with *Mycoplasma agalactiae*. *Cornell Vet journal articles*, 64, 3: 435-442
- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 1:184-191

- Sirand-Pugnet P., Citti C., Barre A., Blanchard A. 2007a. Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Research in Microbiology*, 158: 754-766
- Sirand-Pugnet P., Lartigue C., Marena M., Jacob D., Barre A., Barbe V., Schenowitz C., Mangenot S., Couloux A., Serguere B., de Daruvar A., Blanchard A., Citti C. 2007b. Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. *PLoS Genetics*, 3, 5: e75
- Smith M. C., Sherman D. M. 1994. *Goat Medicine*. 2nd edition. Philadelphia, USA, Lea & Febiger: 620 str.
- Sokolova I. A., Vaughan A. T. M., Khodarev N. N. 1998. *Mycoplasma* infection can sensitize host cells to apoptosis through contribution of apoptotic-like endonuclease(s). *Immunology and Cell Biology*, 76: 526-534
- Somarajan S. R., Kannan T. R., Baseman J. B. 2010. *Mycoplasma pneumoniae* Mpn133 is a cytotoxic nuclease with a glutamic acid, lysine and serine rich region essential for binding and internalization but not enzymatic activity. *Cellular Microbiology* (še neobjavljen članek)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20690923> (18. avg. 2010)
- Stadtlander C. T. K.-H., Watson H. L., Simecka J. W., Cassell G. H. 1993. Cytopathogenicity of *Mycoplasma fermentas* (including strain incognitions). *Clinical Infectious Diseases*, 17, 1: 289-301
- Sun G., Xu X., Wang Y., Shen X., Chen Z., Yang J. 2008. *Mycoplasma pneumoniae* infection induces reactive oxygen species and DNA damage in A549 human lung carcinoma cells. *Infection and Immunity*, 76, 10: 4405-4413
- Taylor R. R., Varsani H., Miles R. J. 1994. Alternatives to arginine as energy sources for the non-fermentative *Mycoplasma gallinarum*. *FEMS Microbiology Letters*, 115: 163-168
- Taylor-Robinson D., Davies H. A., Sarathchandra P., Furr P. M. 1991. Intracellular location of mycoplasmas in cultured cells demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. *International Journal of Experimental Pathology*, 72, 6: 705-714
- Thomas A., Ball H., Dizier I., Trolin A., Bell C., Mainil J., Linden A. 2002. Isolation of mycoplasma species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. *The Veterinary Record*, 151, 16: 472-476
- ter Laak E. A., Tully J. G., Noordergraaf H. H., Rose D. L., Carle P., Bove J. M., Smita M. A. 1993. Recognition of *Mycoplasma canis* as part of the mycoplasmal flora of the bovine respiratory tract. *Veterinary Microbiology*, 34: 175-189

- Vasconcelos A. T. R., Ferreira H. B., Bizarro C. V., Bonatto S. L., Carvalho M. O., Pinto P. M., Almeida D. F., Almeida L. G. P., Almeida R., Alves-Filho L., Assuncao E. N., Azevedo V. A. C., Bogo M. R., Brigido M. M., Brocchi M., Burity H. A., Camargo A. A., Camargo S. S., Carepo M. S., Carraro D. M., Cascardo J. C. M., Castro L. A., Cavalcanti G., Chemale G., Collevatti R. G., Cunha C. W., Dallagiovanna B., Dambros B. P., Dellagostin O. A., Falcao C., Fantinatti-Garboggini F., Felipe M. S. S., Fiorentin L., Franco G. R., Freitas N. S. A., Frias D., Grangeiro T. B., Grisard E. C., Guimaraes C. T., Hungria M., Jardim S. N., Krieger M. A., Laurino J. P., Lima L. F. A., Lopes M. I., Loreto E. L. S., Madeira H. M. F., Manfio G. P., Maranhao A. Q., Martinkovics C. T., Medeiros S. R. B., Moreira M. A. M., Neiva M., Ramalho-Neto C. E., Nicolas M. F., Oliveira S. C., Paixao R. F. C., Pedrosa F. O., Pena S. D. J., Pereira M., Pereira-Ferrari L., Piffer I., Pinto L. S., Potrich D. P., Salim A. C. M., Santos F. R., Schmitt R., Schneider M. P. C., Schrank A., Schrank I. S., Schuck A. F., Seuanes H. N., Silva D. W., Silva R., Silva S. C., Soares C. M. A., Souza K. R. L., Souza R. C., Staats C. C., Steffens M. B. R., Teixeira S. M. R., Urmenyi T. P., Vainstein M. H., Zuccherato L. W., Simpson A. J. G., Zaha A. 2005. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology*, 187, 16: 5568-5577
- Walker E. R., Friedman M. H., Olson N. O., Sahu S. P., Mengoli H. F. 1978. An ultrastructural study of avian synovium infected with an arthrotropic mycoplasma, *Mycoplasma synoviae*. *Veterinary Pathology*, 15: 407-416
- Weir F. 1993. Nucleases: an overview. V: Enzymes of molecular biology. Burrell M. M. (ed.). Totowa, Humana Press Inc.: 1-7
- Williams R. J. 2001. Restriction nucleases and their uses. V: Nuclease methods and protocols. Schein C. H. (ed.). Totowa, humana Press Inc: 409-431
- Zakrajšek T. 2008. Nevraminidazna aktivnost bakterije *Mycoplasma canis*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta. Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 75 str.
- Zeugswetter F., Weissenbock H., Shilby S., Hassan J., Spargser J. 2007. Lethal bronchopneumonia caused by *Mycoplasma cynos* in a litter of golden retriever puppies. *Veterinary Record*, 161, 18: 626-627
- Zhang J., Alt F., Honjo T. 1995. Regulation of class switch recombination of the immunoglobulin heavy chain genes. V: Immunoglobulin genes. Honjo T., Alt F. W. (eds.). San Diego, Academic Press INC.: 235-267

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mojci Narat, ki mi je omogočila izdelavo tega diplomskega dela. Hvala za vodenje, pomoč in koristne nasvete pri laboratorijskem delu in izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se somentorici dr. Ireni Oven za pomoč in koristne nasvete pri laboratorijskem delu ter izdelavi diplomske naloge. Hvala za veliko pozitivne energije.

Zahvaljujem se znanstvenemu svetniku dr. Dušanu Benčini za koristne nasvete in pripombe pri oblikovanju diplomske naloge.

Vsem trem se zahvaljujem za hiter in temeljit pregled diplomske naloge!

Največja zahvala gre Daliborki Dušanić za pomoč, nasvete, čas in potrpežljivost pri laboratorijskem delu ter obilo dobre volje.

Zahvaljujem se tudi vsem tistim na Oddelku za zootehniko, ki ste mi med laboratorijskim delom in izdelavo te diplomske naloge kakorkoli priskočili na pomoč s svojim znanjem, izkušnjami in koristnimi nasveti.

Posebna zahvala je namenjena mojim staršem in sestri Petri. Hvala, ker ste mi stali ob strani, mi pomagali in me spodbujali ter verjeli vame skozi vsa ta leta.
Brez vas mi ne bi uspelo!

Hvala tudi vsem prijateljem in znancem za ves čas, ki smo ga preživeli skupaj. Hvala za pomoč v težkih trenutkih, zaupanje in veliko veselja.
Najboljši ste!

Priloga A

Primerjava ohranjenosti aminokislin pri homolognih proteinskih zaporedjih za nukleaze tipa mhp379, pri različnih vrstah mikoplazem. Primerjavo zaporedij smo opravili s programom BLASTp, kjer smo proteinsko zaporedje nukleaze MAG_5040 bakterije *M. agalactiae* primerjali z zaporedji nukleaz ostalih mikoplazemskih vrst.

| Vrsta | Sev | Protein | Število AK ¹ | % identičnih ² AK | % podobnih ³ AK | % vrzeli ⁴ | Rezultat poravnave ⁵ |
|---------------------------------|-----------|------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| <i>Mycoplasma agalactiae</i> | PG2 | MAG_5040 | 390 | 100 | 100 | 0 | 787 |
| | 5632 | MAGa5510 | 390 | 94 | 97 | 0 | 751 |
| <i>Mycoplasma fermentas</i> | PG12 | hipotetični protein | 399 | 43 | 57 | 6 | 149 |
| <i>Mycoplasma synoviae</i> | 53 | MS_0284 | 451 | 39 | 56 | 4 | 141 |
| | 53 | MS_0110 | 239 | 25 | 48 | 11 | 40 |
| <i>Mycoplasma alligatoris</i> | A21JP2 | nukleazi podoben lipoprotein | 293 | 35 | 54 | 11 | 128 |
| <i>Mycoplasma crocodyli</i> | MP145 | MCRO_0706 | 301 | 34 | 56 | 8 | 117 |
| | MP145 | MCRO_0604 | 211 | 30 | 46 | 20 | 37 |
| <i>Mycoplasma pulmonis</i> | AUAB CTIP | MYPUP_0250 | 256 | 35 | 50 | 10 | 91,7 |
| <i>Mycoplasma arthritis</i> | 158L3-1 | MARTH_orf834 | 311 | 34 | 54 | 6 | 81,6 |
| <i>Mycoplasma gallisepticum</i> | Rlow | MGA_0676 | 276 | 29 | 47 | 9 | 74,7 |
| | F | nukleazi podoben lipoprotein | 276 | 30 | 49 | 6 | 74,3 |
| <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> | 7448 | MHP7448_0368 | 310 | 32 | 51 | 12 | 72 |
| | J | MHJ_0364 | 310 | 32 | 51 | 12 | 71,6 |
| | 232 | mhp379 | 310 | 32 | 51 | 12 | 71,6 |
| <i>Mycoplasma hominis</i> | | MHO_0730 | 321 | 31 | 46 | 14 | 70,1 |
| <i>Mycoplasma conjunctivae</i> | HRC/581 | MCI_000150 | 305 | 29 | 50 | 14 | 66,2 |
| <i>Mycoplasma mobile</i> | 163K | nuc | 200 | 29 | 48 | 16 | 47,4 |

¹ Aminokislina

² Odstotek identičnih aminokislin, v poravnavi med proteinskima zaporedjema MAG_5040 in homologom.

³ Odstotek aminokislin, ki so si podobne v fizikalno- kemijskih lastnostih v poravnavi med proteinskima zaporedjema MAG_5040 in homologom.

⁴ Odstotek vrzeli v poravnavi med proteinskima zaporedjema MAG_5040 in homologom, ki so posledica insercij ali delecij.

⁵ Odras ujemanj, neujemanj in vrzeli med proteinskima zaporedjema MAG_5040 in homologom (večji kot je rezultat, bolj homologni sta si zaporedji).