UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Rok KOPINČ

VLOGA HOMEOSTAZE ŽELEZA V EKOLOGIJI PODVRST BAKTERIJE *Mycobacterium avium*

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Rok KOPINČ

VLOGA HOMEOSTAZE ŽELEZA V EKOLOGIJI PODVRST BAKTERIJE *Mycobacterium avium*

DOKTORSKA DISERTACIJA

ROLE OF IRON HOMEOSTASIS IN THE ECOLOGY OF *Mycobacterium avium* SUBSPECIES

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Rok KOPINČ

VLOGA HOMEOSTAZE ŽELEZA V EKOLOGIJI PODVRST BAKTERIJE *Mycobacterium avium*

DOKTORSKA DISERTACIJA

ROLE OF IRON HOMEOSTASIS IN THE ECOLOGY OF *Mycobacterium avium* SUBSPECIES

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Investing in your future
OPERATION PART FINANCED BY THE EUROPEAN UNION
European Social Fund

POPRAVKI:

Doktorska disertacija je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študijskega programa biomedicine, področje genetika. Delo je bilo v celoti opravljeno v laboratorijih Inštituta za fizikalno biologijo d.o.o., Ljubljana.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij z dne 7.11. 2010 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicine, področje genetika. Za mentorja je bil imenovan znan. sod. dr. Aleš Lapanje.

Mentor: znan. sod. dr. Aleš LAPANJE
Inštitut za fizikalno biologijo, d.o.o.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana Marinšek Logar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Simon Horvat
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: viš. znan. sod. dr. Matjaž Ocepek
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta,
Oddelek za mikrobiologijo in parazitologijo

Član: znan. sod. dr. Aleš Lapanje
Inštitut za fizikalno biologijo, d.o.o.

Datum zagovora: 28.03.2013

Delo 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.

Doktorand:
Rok KOPINČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 579.26:577.2:615.33(043.4)=163.6
KG mikobakterije/siderofori/*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*/amebe/*Mycobacterium avium* ssp. *hominissuis*/transkriptomika/primerjalna genomika/odpornost na antibiotike/qPCR/resazurin
AV KOPINČ, Rok, univ. dipl. biokem.
SA LAPANJE, Aleš (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Biomedicine, področje genetike
LI 2013
IN VLOGA HOMEOSTAZE ŽELEZA V EKOLOGIJI PODVRST BAKTERIJE *Mycobacterium avium*
TD Doktorska disertacija
OP XV, 139 str., 16 pregl., 40 sl., 10 pril., 336 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Mikobakterije iz podvrst *M. avium* za pridobivanje železa proizvajajo siderofore – mikobaktine. Kljub ohranjenosti operonov za sintezo mikobaktina med podvrstami, le *Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis* (MAP) ne proizvaja lastnega mikobaktina. MAP je intracelularni patogen, dalj časa pa lahko preživi tudi v okolju izven gostitelja. V okviru raziskave smo hoteli ugotoviti, kaj je vzrok za odsotnost sinteze mikobaktina in kako bakterije podvrste MAP preživijo v okolju brez lastnih sideroforov. Primerjava mikobaktinskih operonov med podvrstami je pokazala številne nesmiselne mutacije v posameznih sinteznih genih pri različnih tipih bakterij podvrste MAP, kljub temu je bilo izražanje vseh genov ohranjeno. V primerjavi z bakterijo *M. avium* podvrste *hominissuis* (MAH), so bili nivoji transkriptov pri bakteriji podvrste MAP za večino genov višji, kot posledica neučinkovitega privzema železa, izražanje gena *mbtA* pa se je bistveno razlikovalo med obema bakterijama, kar bi lahko bil razlog za okvarjeno sintezo mikobaktina pri bakterijah podvrste MAP tipa II. Zaradi degenerativne evolucije predvidevamo, da mikobaktinski operoni niso potrebni za preživetje bakterij podvrste MAP. Detekcija IS*900* s kvantitativnim PCR (qPCR) na dveh kmetijah s primeri paratuberkuloze je pokazala visoko stopnjo kontaminacije okolja z bakterijo podvrste MAP, ki je bila stabilna ob več vzorčenjih tekom dveh let. S qPCR detekcijo IS*1245* smo ugotovili, da je prisotnost te IS signifikantno povezana s prisotnostjo IS*900*, kar kaže na prekrivanje življenjskih okolij različnih podvrst *M. avium* in s tem možnost za bakterije podvrste MAP, da koristijo eksogene vire mikobaktina v okolju. Pokazali smo, da so bakterije podvrste MAP odporne na fagocitozo različnih vrst ameb, ki smo jih izolirali iz vzorcev iz kmetij, kar je predpogoj za intracelularno lokacijo bakterij podvrste MAP in dolgoročno perzistenco v okolju. Nazadnje smo z resazurinsko metodo ugotovili, da pomanjkanje železa močno vpliva na odpornost na antibiotike pri bakterijah podvrste MAH in MAP, vendar se le pri slednji kaže kot povečana občutljivost na večino testiranih antibiotikov. Predvidevamo, da je to posledica znižane sposobnosti ohranjanja homeostaze železa pri bakterijah podvrste MAP, delno zaradi okvare v sintezi sideroforov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 579.26:577.2:615.33(043.4)=163.6
CX mycobacteria/siderophores/*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*/amoebae/ *Mycobacterium avium* ssp. *hominissuis*/transcriptomics/comparative genomics/antibiotic resistance/qPCR/resazurin
AU KOPINČ, Rok
AA LAPANJE, Aleš (supervisor)
PP University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biomedicine, Field: Genetics
PY 2013
TI ROLE OF IRON HOMEOSTASIS IN THE ECOLOGY OF *Mycobacterium avium* SUBSPECIES
DT Doctoral Dissertation
NO XV, 139 p., 16 tab., 40 fig., 10 ann., 336 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Iron acquisition in *Mycobacterium avium* subspecies is mediated by siderophores, namely mycobactins. Although operons for mycobactin biosynthesis are conserved among subspecies, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) does not produce its own mycobactin. MAP is an intracellular pathogen that can survive for extended periods in the environment outside the host. Accordingly, in our study, we wanted to determine, what the cause for the lack of mycobactin biosynthesis is and how MAP survives in the environment without its own siderophores. Comparison of mycobactin synthesis operons among *M. avium* subspecies has shown that multiple nonsense mutations have accumulated in different genes of *mbt* operons in all studied MAP strains. However, we have shown that all of the genes are actively transcribed. In comparison to *M. avium* ssp. *hominissuis* (MAH), transcript levels of most of the *mbt* genes were higher in MAP, most likely as a result of inefficient iron acquisition. Expression of *mbtA* gene in MAP was significantly different compared to MAH, which might underlie the defect in mycobactin synthesis in MAP type II. Due to observed degenerative evolution of *mbt* operons in MAP we suspect that the functionality of these operons is not needed for survival of MAP. Real-time quantitative detection of IS*900* on two farms with a history of paratuberculosis has shown high level of environmental contamination, which was stable during two years' sampling. qPCR detection of IS*1245* showed that the presence of this IS significantly correlated with the presence of IS*900*, which indicates that the habitats of different *M. avium* subspecies overlap in a dependent manner, pointing to a possibility for MAP to exploit exogenous sources of mycobactin in the environment. We have shown that MAP is resistant to phagocytosis of amoeba, isolated from the same environment, which is a prerequisite for intracellular localization of MAP and long term persistence in the environment. Finally we have shown that low iron conditions significantly affect antibiotic susceptibility of MAH and MAP. However, only MAP shows hyper sensibility to most of the tested antibiotics in these conditions, which we propose is due to lowered capability of sustaining iron homeostasis, partly due to lack of mycobactin synthesis.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA ... III
KEY WORDS DOCUMENTATION ... IV
KAZALO VSEBINE ... V
KAZALO PREGLEDNIC ... IX
KAZALO SLIK ... X
KAZALO PRILOG ... XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI ... XIII
SLOVARČEK ... XV
1 UVOD ... 1
2 PREGLED LITERATURE ... 3
2.1 GLAVNE ZNAČILNOSTI IN KLINIČNA VLOGA MIKOBAKTERIJ ... 3
2.2 PODVRSTE BAKTERIJE *MYCOBACTERIUM AVIUM* ... 3
2.2.1 Primerjalna genomika in evolucija podvrst bakterije *M. avium* ... 3
2.2.2 *Mycobacterium avium* podvrste *hominissuis* ... 6
2.2.2.1 Splošne značilnosti bakterij podvrste MAH ... 6
2.2.2.2 Epidemiologija bakterij podvrste MAH ... 6
2.2.2.3 Patogeneza bakterij podvrste MAH ... 6
2.2.3 *Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis* ... 8
2.2.3.1 Splošne značilnosti bakterij podvrste MAP ... 8
2.2.3.2 Epidemiologija bakterij podvrste MAP ... 8
2.2.3.3 Patogeneza bakterij podvrste MAP v primerjavi z bakterijami podvrste MAH ... 10
2.2.4 Ekologija podvrst bakterije *Mycobacterium avium* ... 11
2.2.4.1 Fiziološke predispozicije mikobakterij ... 11
2.2.4.2 Ekologija bakterij podvrste MAH ... 12
2.2.4.3 Ekologija bakterij podvrste MAP ... 13
2.2.6.4 Vloga praživali pri ekologiji mikobakterij in podvrst bakterije *Mycobacterium avium* ... 16
2.3 HOMEOSTAZA ŽELEZA ... 20
2.3.1 Pomen in dostopnost železa ... 20
2.3.2 Odziv mikobakterij na pomanjkanje železa ... 21
2.3.3 Homeostaza železa in občutljivost na antibiotike ... 22
2.3.4 Mehanizmi privzema železa pri mikobakterijah ... 23
2.3.5 Mikobaktini ... 26
2.3.5.1 Struktura mikobaktinov ... 26
2.3.5.2 Biosinteza ... 27

2.3.5.3 Vloga mikobaktinov v makrofagih ... 29
2.3.5.4 Regulacija operonov za sintezo mikobaktina ... 30
2.3.5.5 Mikobaktini pri bakterijah podvrste MAP ... 32
2.3.5.5.1 Primerjalna genomika in ohranjenost mbt operonov pri M. avium podvrste paratuberculosis ... 33
2.3.5.5.2 Transkripcijska aktivnost in regulacija mbt operonov pri M. avium podvrste paratuberculosis ... 35
2.3.5.5.3 Proteomske analize izražanja encimov za sintezo mikobaktina pri M. avium podvrste paratuberculosis ... 35
3 MATERIAL IN METODE ... 36
3.1 EKSPERIMENTALNI ORGANIZMI ... 36
3.1.1 Mikobakterije ... 36
3.1.2 Druge bakterije ... 36
3.1.3 Amebe ... 36
3.2 GOJENJE ... 36
3.2.1 Gojenje mikobakterij ... 36
3.2.1.1 Gojišča za vzdrževanje kultur ... 36
3.2.1.2 Gojišča za poskuse z amebami ... 37
3.2.1.3 Gojišče za poskuse z različnimi koncentracijami železa ... 37
3.2.1.4 Preverjanje čistosti mikobakterijskih kultur ... 37
3.2.2 Gojenje ameb ... 37
3.2.2.1 Gojišča za amebe ... 37
3.2.2.2 Izolacija ameb iz okoljskih vzorcev ... 38
3.2.2.3 Poskusi prehranjevanja ameb z mikobakterijami ... 39
3.2.2.4 Intracelularno preživetje mikobakterij v amebah ... 40
3.3 BARVANJE PO ZIEHL-NEELSNU ... 40
3.4 VZORČENJE ... 41
3.5 METODE ZA IZOLACIJO DNK ... 42
3.5.1 Izolacija DNK iz čistih kultur ... 42
3.5.1.1 Izolacija mikobakterijske DNK ... 42
3.5.1.2 Izolacija amebne DNK ... 42
3.5.2 Optimizacija protokolov za izolacijo mikobakterijske DNK iz okoljskih vzorcev ... 42
3.5.3 Izolacija DNK iz okoljskih vzorcev in govejega fecesa ... 44
3.5.3.1 Trdni vzorci in tekočinski vzorci, ki so vsebovali veliko suspendiranih delcev ... 44
3.5.3.2 Tekočinski vzorci, ki so vsebovali malo suspendiranih delcev ... 45
3.5.4 Izolacija plazmidne DNK ... 45

3.6 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR) ... 45
3.6.1 Pomnoževanje IS*900*, IS*1245* in IS*901* za preverjanje čistosti kultur ... 45
3.6.2 Pomnoževanje gena za bakterijsko 16S rRNK in restrikcijska analiza ... 46
3.6.3 Pomnoževanje gena za 18S rRNK ameb ... 47
3.6.4 PCR na osnovi bakterijske kolonije ... 47
3.7 IZOLACIJA RNK ZA ANALIZO IZRAŽANJA *MBT* OPERONOV ... 48
3.7.1 Eksperimentalni pogoji ... 48
3.7.2 Izolacija RNK ... 49
3.8 PRIPRAVA CDNK ... 50
3.8.1 Odstranjevanje genomske DNK ... 50
3.8.2 Reverzna transkripcija ... 50
3.9 KVANTITATIVNI REAL-TIME PCR ... 50
3.9.1 Začetni oligonukleotidi ... 50
3.9.2 Priprava kvantifikacijskih standardov ... 53
3.9.2.1 Pomnoževanje s PCR in kloniranje ... 53
3.9.2.2 Določevanje koncentracije kvantifikacijskih standardov ... 53
3.9.3 Kvantifikacija IS*900* in detekcija IS*1245* ... 54
3.9.3.1 Izvedba kvantifikacije ... 54
3.9.3.2 Statistična obdelava ... 55
3.9.4 Kvantifikacija izražanja genov *mbt* operonov in drugih genov ... 55
3.9.4.1 Izvedba kvantifikacije ... 55
3.9.4.2 Statistična obdelava ... 56
3.10 *IN SILICO* METODE PRIMERJALNE GENOMIKE ... 57
3.11 DOLOČEVANJE ODPORNOSTI NA ANTIBIOTIKE ... 58
3.11.1 Predpogojevanje kultur ... 58
3.11.2 Priprava bakterijskih suspenzij ... 58
3.11.3 Antibiotiki ... 59
3.11.4 Resazurinska metoda ... 59
4 REZULTATI ... 61
4.1 OPTIMIZACIJA METODE ZA IZOLACIJO DNK IZ MIKOBAKTERIJ ... 61
4.2 DETEKCIJA IS*900* IN IS*1245* V OKOLJSKIH VZORCIH ... 62
4.2.1 Specifičnost pomnoževanja IS*900* in IS*1245* ... 62
4.2.2 Porazdelitev IS*900* in IS*1245* pozitivnih vzorcev v okolju ... 63
4.2.3 Analiza rezultatov kvantifikacije IS*900* ... 69
4.2.4 Povezava med prisotnostjo IS*900* in IS*1245* ... 70
4.3 INTERAKCIJE MED PODVRSTAMI BAKTERIJE *MYCOBACTERIUM AVIUM* IN OKOLJSKIMI AMEBAMI ... 73

4.3.1 Prisotnost ameb v vzorcih iz okolice kmetij in izolacija ameb 73
4.3.2 Prehranjevanje ameb z mikobakterijami 73
4.3.3 Preživetje mikobakterij v amebah iz rodu *Acanthamoeba* 75
4.4 PRIMERJALNA GENOMIKA *MBT* OPERONOV 76
4.4.1 Primerjava celotnih *mbt* operonov različnih podvrst bakterije *Mycobacterium avium* 76
4.4.2 Primerjava IdeR vezavnih regij in drugih genov 79
4.5 ANALIZA IZRAŽANJA *MBT* OPERONOV 82
4.5.1 Preliminarni poskus – preverjanje izražanja posameznih genov *mbt* operonov pri MAH 104 in MAP 468/09 82
4.5.2 Odvisnost izražanja *mbt* genov od faze rasti in prisotnosti železa pri MAH 104 in MAP CLIJ623 84
4.5.3 Primerjava izražanja *mbt* genov med MAH 104 in MAP CLIJ623 87
4.6 ODPORNOST NA ANTIBIOTIKE V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE ŽELEZA V GOJIŠČU 89
4.6.1 Spremembe v odpornosti na antibiotike pri bakteriji MAH 104 89
4.6.2 Spremembe v odpornosti na antibiotike pri bakteriji MAP 468/09 92
4.6.3 Primerjava sprememb v odpornosti na antibiotike med bakterijama MAH 104 in MAP 468/09 95
5 RAZPRAVA IN SKLEPI 96
5.1 RAZPRAVA 96
5.1.1 Primerjalna genomika in transkriptomika *mbt* operonov 96
5.1.1.1 Primerjalna genomika *mbt* operonov 96
5.1.1.2 Transkriptomika *mbt* operonov 99
5.1.2 Preživetje bakterij podvrste MAP v okolju 103
5.1.2.1 Razširjenost in dinamika bakterij podvrste MAP v okolju 103
5.1.2.2 Razširjenost drugih podvrst bakterije *M. avium* in njihova povezava z bakterijami podvrste MAP 106
5.1.2.3 Perzistenca MAP v okolju v povezavi z amebami 108
5.1.3 Vpliv pomanjkanja železa na odpornost na antibiotike 111
5.1.3.1 Vpliv pomanjkanja železa na odpornost na antibiotike pri bakterijah podvrste MAH 111
5.1.3.2 Vpliv pomanjkanja železa na odpornost na antibiotike pri bakterijah podvrste MAP 113
5.2 SKLEPI 115
6 POVZETEK (SUMMARY) 117
6.1 POVZETEK 117
6.2 SUMMARY 119
7 VIRI 121
ZAHVALA
PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

		Str.
Pregl. 1:	Interakcije mikobakterij z amebami	18
Pregl. 2:	Strukturna raznolikost mikobaktinov in karboksimikobaktinov	26
Pregl. 3:	Geni operonov za sintezo mikobaktinov	28
Pregl. 4:	Sestava Prescott-James-ove raztopine	38
Pregl. 5:	Sestava PAS (Page's amoeba saline) raztopine	38
Pregl. 6:	Začetni oligonukleotidi uporabljeni pri pomnoževanju insercijskih zaporedij za preverjanje čistosti kultur	46
Pregl. 7:	Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje odseka gena za 18S rRNK	47
Pregl. 8:	Začetni oligonukleotidi za gene *mbt* operonov in drugih genov	51
Pregl. 9:	Začetni oligonukleotidi za kvantifikacijo IS*900* in IS*1245*	52
Pregl. 10:	Genomi uporabljeni v primerjalno genomskih analizah	58
Pregl. 11:	Identifikacija pomnožkov gena za 18S rRNK iz izoliranih ameb z uporabo EukA/EukB seta začetnih nukleotidov	73
Pregl. 12:	Sposobnost prehranjevanje *Acanthamoebe sp*. B3 in *Hartmanelle sp.* z mikobakterijami	75
Pregl. 13:	Primerjava predvidenih odprtih bralnih okvirjev (ORF) v *mbt* operonih različnih podvrst *Mycobacterium avium*	78
Pregl. 14:	MIC vrednosti testiranih antibiotikov v $[Fe]_{+}$, $[Fe]_{\Delta}$ and $[Fe]_{-}$ pogojih za *Mycobacterium avium* ssp. *hominissuis*, sev 104	90
Pregl. 15.	MIC vrednosti testiranih antibiotikov v $[Fe]_{+}$, $[Fe]_{\Delta}$ and $[Fe]_{-}$ pogojih za *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, sev 468/09	93
Pregl. 16.	Primerjava sprememb v odpornosti na antibiotike pri MAP 468/09 in MAH 104 v odvisnosti od koncentracije železa	95

KAZALO SLIK

		Str.
Sl. 1:	Filogenetsko drevo podvrst bakterije *Mycobacterium avium* (Turenne in sod., 2008)	5
Sl. 2:	Predlagan potek evolucije genoma MAH do ovčjega (tip I in III) in govejega tipa (tip II) MAP (Bannantine in sod., 2012)	5
Sl. 3:	Shematski prikaz kroženja bakterij podvrst MAH in MAP v okolju	15
Sl. 4:	Transport železa pri mikobakterijah (Jones in Niederweis, 2010; Tullius in sod., 2011)	25
Sl. 5:	Struktura mikobaktinov (De Voss in sod., 1999)	26
Sl. 6:	Predlagana shema biosinteze mikobaktina (De Voss in sod., 1999; Krithika in sod., 2006; Quadri in sod., 1998; Zwahlen in sod., 2007)	29
Sl. 7:	Mehanizem regulacije z IdeR (Chou in sod., 2004; Wisedchaisri in sod., 2004)	31
Sl. 8:	Regulacija *mbt*, *irt* in *bfr* operonov pri *M. tuberculosis* (Rodriguez, 2006)	32
Sl. 9:	Regulacija transkripcije *bfrA* pri *M. tuberculosis* (Gold in sod., 2001)	32
Sl. 10:	Ohranjenost *mbt-1* operona pri mikobakterijah v primerjavi s 16S rRNK filogenijo (Chavadi in sod., 2011)	34
Sl. 11:	Shema folije za določanje hitrosti migracije ameb	39
Sl. 12:	Shema priprave kultur za analizo izražanja mbt operonov	48
Sl. 13:	Shema nanosa na mikrotitrsko ploščo za poskus odpornosti mikobakterij na antibiotike	60
Sl. 14:	Kvantitativna primerjava učinkovitosti različnih protokolov za izolacijo DNK iz mikobakterij	61
Sl. 15:	Analiza kvalitete DNK izolirane z različnimi metodami	62
Sl. 16:	Porazdelitev IS*900* in IS*1245* na kmetijah A in B	63
Sl. 17:	Geografska porazdelitev IS*900* in IS*1245* pozitivnih vzorcev na kmetiji A in v bližnji okolici	65
Sl. 18:	Geografska porazdelitev IS*900* in IS*1245* pozitivnih vzorcev v širši okolici kmetije A	66
Sl. 19:	Geografska porazdelitev IS*900* in IS*1245* pozitivnih vzorcev na kmetiji B in v bližnji okolici	67
Sl. 20:	Geografska porazdelitev IS*900* in IS*1245* pozitivnih vzorcev na v širši okolici kmetije B	68
Sl. 21:	Primerjava števila kopij IS*900* po razredih vzorcev	69
Sl. 22:	Primerjava števila kopij IS*900* po datumih vzorčenja	70
Sl. 23:	Vennovi diagrami povezave med IS*900* in IS*1245*	71
Sl. 24:	Primerjava števila kopij IS*900* v IS*1245* pozitivnih in negativnih vzorcih	72
Sl. 25:	Sposobnost prehranjevanja amebe *Acanthamoeba sp.* KC z različnimi bakterijami	75
Sl. 26:	Rast MAH 104 izven območja inokulacije	76
Sl. 27:	Grafična primerjava *mbt* operonov pri različnih podvrstah bakterije *Mycobacterium avium*	77
Sl. 28:	Poravnava IdeR vezavnih mest med *mbtA* in *mbtB* pri različnih podvrstah bakterije *M. avium* in tipih MAP	79

Sl. 29: Poravnava IdeR vezavnih mest v promotorju *mbtL* pri različnih podvrstah bakterije *M. avium* in tipih MAP 80
Sl. 30: Poravnava IdeR vezavnih mest v promotorju *bfrA* pri različnih podvrstah bakterije *M. avium* in tipih MAP 81
Sl. 31: Filogenija IdeR gena pri podvrstah bakterije *M. avium* in tipih MAP 81
Sl. 32: Izražanje genov *mbt* operonov pri MAH 104 in MAP 468/09 83
Sl. 33: Izražanje drugih genov domnevno povezanih s privzemom železa pri MAH 104 in MAP 468/09 84
Sl. 34: Rastna krivulja MAH 104 in MAP CLIJ623 v gojišču brez in z železom 85
Sl. 35 Razmerje izražanja genov pri MAH 104 v gojišču brez (LI) in z železom (HI) po fazah rasti 86
Sl. 36 Razmerje izražanja genov pri MAP CLIJ623 v gojišču brez (LI) in z železom (HI) po fazah rasti 87
Sl. 37: Primerjava ravni transkriptov analiziranih genov v stacionarni fazi med MAH 104 in MAP CLIJ623 v gojišču brez železa 88
Sl. 38: Primerjava razmerij med izražanjem posameznih genov v pogojih brez (LI) in z železom (HI) pri MAH 104 in MAP CLIJ623 v stacionarni fazi rasti 89
Sl. 39: Profili inhibicije rasti MAH 104 91
Sl. 40: Profili inhibicije rasti MAP 468/09 94

KAZALO PRILOG

Priloga A: Poravnava pomnoženih odsekov IS*900* in IS*1245* z zaporedjem IS*900* in IS*1245* iz baze nukleotidnih zaporedij
Priloga B: Razdelitev okoljskih vzorcev po razredih glede na izvor
Priloga C: Popis vzorčnih mest, število kopij IS*900* in prisotnost IS*1245* v vzorcih s kmetij
Priloga D: Mikroskopiranje vzorcev iz kmetije A in B ter izoliranih ameb iz okoljskih vzorcev
Priloga E: Filogenetska drevesa in poravnave promotorskih regij *mbt* operonov in drugih genov pri različnih podvrstah bakterije *M. avium*
Priloga F: Statistična obdelava podatkov izražanja *mbt* operonov in drugih
Priloga G: Primerjava ravni analiziranih genov v stacionarni fazi med MAH 104 in MAP CLIJ623
Priloga H: Rast MAH 104 in MAP 468/09 v pozitivnih kontrolah (brez antibiotikov) pri različnih eksperimentalnih pogojih, določena z resazurinsko metodo
Priloga I: Preliminarni poskusi za izbiro optimalnih časov inkubacije in koncentracije začetne kulture MAH 104 in MAP 468/09 za merjenje inhibicije rasti z resazurinom
Priloga J: Razlike v odpornosti na antibiotike med MAP 468/09 in MAH 104 pri različnih pogojih dostopnosti železa

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACP	acil nosilni protein
AIDS	sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti
AMP	adenozin monofosfat
ArCP	aroil nosilni protein
Asp	aspartat
AZM	azitromicin
bp	bazni par
cDNK	kopirana DNK
cMB	karboksimikobaktin
DCS	D-cikloserin
dH_2O	destilirana voda
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ELISA	encimskoimunski test
EMA	etidijev monoazid
EMB	etambutol
Fe-cMB	feri-karboksimikobaktin
FAD	flavin adenin dinukleotid
GM-CSF	spodbujevalni dejavnik rasti kolonij granulocitov in makrofagov
HTH	heliks-zavoj-heliks
IFN-γ	interferon gama
IL	interleukin
INH	isoniazid
IREP	z železom regulirani proteini ovojnice
IS*900*	insercijsko zaporedje, tip *900*
IS901	insercijsko zaporedje, tip *901*
IS*1245*	insercijsko zaporedje, tip *1245*
iTRAQ	izobarično označevanje za absolutno in relativno kvantifikacijo (proteinov)
KOPB	kronična obstruktivna pljučna bolezen
Lys	lizin
LSP	polimorfizem daljših zaporedij
LVX	levofloksacin
MAA	*Mycobacterium avium* podvrste *avium*
MAH	*Mycobacterium avium* podvrste *hominissuis*
MAP	*Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis*
MAS	*Mycobacterium avium* podvrste *silvaticum*
MB	mikobaktin
MLSA	analiza multilokusnih zaporedij
Mramp	mikobakterijski z odpornostjo povezan makrofagni protein
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NO	dušikov oksid
Nramp1	naravni z odpornostjo povezan makrofagni protein 1, uradni simbol SLC11A1 (*ang.* solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1)
NRPKS	neribosomalne poliketidne sintetaze

NRPS	neribosomalne peptidne sintetaze
nt	nukleotid
NTM	netuberkulozne mikobakterije
OADC	oleinska kislina, albumin, dekstroza, katalaza (dodatek za gojišče)
ORF	odprt bralni okvir
OXA	oksacilin
PAS	para-aminosalicilat
PCP	peptidil nosilni protein
PCR	verižna reakcija polimeraze
PDB	Proteinska baza podatkov (*ang.* Protein Data Bank)
PMA	propidijev monoazid
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov
RIF	rifampicin
RNK	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove spojine
SAL	salicilat
SH3	Src homologna domena 3
SNP	polimorfizem posameznih nukloetidov
ST	sobna temperatura
STR	streptomicin
Ta	temperatura pripenjanja začetnih oligonukleotidov v PCR reakciji
TNF-α	tumor nekrosis faktor alfa
T_H1, T_H2	T celice pomagalke tipa 1 in 2
X-gal	5-bromo-4-kloro-indolil-β-D-galaktopiranozid
ZO	začetni oligonukleotid
3-NPA	3-nitropropionska kislina
6-MP	6-merkaptopurin

SLOVARČEK

ABC transporter
: ATP vezavni kasetni transporter, zelo razširjena in ohranjena družina transmembranskih proteinov za translokacijo različnih molekul čez membrano

Acil
: radikal karboksi kislin

Aroil
: radikal aromatskih karboksi kislin

Cista
: ameba v vegetativni, mirujoči fazi, za katero je značilna tvorba zaščitne celične ovojnice

Feroportin
: transportni protein za železo v makrofagih in črevesnih epitelijskih celicah sesalcev, tudi SLC40A1

Hemofori
: bakterijski proteini z visoko afiniteto za hem

Holoprotein
: protein brez vezanega kofaktorja/liganda, nasprotje je apoprotein

Ionofori
: lipofilne molekule, ki povečajo prepustnost membrane za ione

IREP proteini
: z železom regulirani proteini ovojnice pri mikobakterijah, v glavnem vpleteni v transport železa preko celične stene

iTRAQ
: metoda za absolutno in relativno kvantifikacijo izražanja proteinov z izobaričnimi oznakami s pomočjo tekočinske kromatografije in masne spektrometrije

Nesinonimne zamenjave nukleotidov
: mutacije, kjer se nukleotid na določenem mestu v genomu zamenja z drugim nukleotidom, pri čemer se spremenjeni nukleotidni triplet prevede v drugo aminokislino, kot pred mutacijo; nasprotje – sinonimna zamenjava nukleotida

PE, PPE proteini
: proteini z ohranjenim (ponavljajočim) motivom prolin-glutamat (PE) in prolin-prolin-glutamat (PPE); geni za PE/PPE proteine pri *M. tubercuolsis* predstavljajo 10% genoma

Trofozoita
: ameba v fazi aktivnega prehranjevanja

1 UVOD

Homeostaza železa je eden temeljnih procesov vseh živih bitij. Železo je pomemben kofaktor in katalizator številnih encimskih reakcij v bakterijski celici, pomembno vlogo ima tudi pri vzdrževanju redoks ravnovesja. V aerobnem okolju je železo slabo topno in prisotno večinoma v precipitatih železovih oksidov in hidroksidov, zaradi česar je neposredna dostopnost železa za bakterije omejena (Boukhalfa in Crumbliss, 2002). V gostiteljih je dostopnost železa omejena kot del obrambnega mehanizma proti nevarnim patogenom (Miethke in Marahiel, 2007). Za preživetje v okoljih z omejenimi količinami železa so bakterije razvile različne mehanizme privzema železa, ki temeljijo predvsem na sintezi nizkomolekularnih spojin z visoko afiniteto za železo – sideroforov. Pri mikobakterijah sta ključni predvsem dve vrsti sideroforov, mikobaktini in eksohelini. Saprofitske mikobakterije proizvajajo obe vrsti sideroforov, medtem ko patogene, kot so *M. tuberculosis* in *M. avium*, le mikobaktine (De Voss in sod., 1999). Podvrste bakterije *M. avium* so genetsko zelo sorodne, vendar pa le bakterije *M. avium* podvrste *paratuberculosis* (MAP) ne proizvajajo mikobaktina in so *in vitro* odvisne od dodatka eksogenega vira tega siderofora. Operoni za sintezo mikobaktina (*mbt* operoni) so ohranjeni pri vseh podvrstah *M. avium* (Li in sod., 2005), zato ni jasno, kaj je vzrok za odsotnost sinteze mikobaktina. Bakterije podvrste MAP so podobno kot ostale mikobakterije intracelularni patogeni, ki se razmnožujejo v gostiteljevih makrofagih. Za uspešno rast mikobakterij v makrofagih in širjenje infekcije je mikobaktin ključnega pomena (De Voss in sod., 2000). Zato se postavlja vprašanje, kako bakterije podvrste MAP preživijo v gostitelju, glede na to, da ne proizvajajo mikobaktina in na kakšen način ohranjajo homeostazo železa.

Odsotnost sinteze mikobaktina je lahko posledica okvare na različnih ravneh: genetski, transkripcijski, post-transkripcijski, regulatorni, ali pa obstajajo še drugi trans-delujoči genetski in okoljski elementi. Funkcionalnost *mbt* operonov pri bakterijah podvrste MAP še ni bila raziskana na nobeni izmed omenjenih ravni. V okviru naše raziskave smo zato analizirali funkcionalnost *mbt* operonov na dveh ravneh. Najprej smo primerjali zaporedja posameznih mikobaktinskih genov, regulatornih regij in organizacijo *mbt* operonov med različnimi tipi MAP in drugimi podvrstami bakterije *M. avium*, ki so sposobne lastne sinteze sideroforov. Nato smo izvedli še analizo transkripcijske aktivnosti celotnih operonov pri bakteriji podvrste MAP govejega tipa in jo primerjali z aktivnostjo pri bakteriji *M. avium* podvrste *hominissuis* (MAH), ki je evolucijsko najbližji prednik podvrste MAP in proizvaja svoj lastni mikobaktin.

Pri prehodu iz gostitelja v zunanje okolje se morajo bakterije podvrste MAP prilagoditi različnim pogojem, vsekakor pa morajo preživeti, da se lahko prenesejo na novega gostitelja. Za bakterije podvrste MAP je značilno, da so izven gostitelja sposobne preživeti daljša obdobja (Whittington in sod., 2004). V okolju poteka velika kompeticija za nutriente in esencialne minerale, tudi za železo. Zato je tudi v tem primeru zanimivo vedeti, kako bakterije podvrste MAP preživijo v okolju z vidika pridobivanja železa. Glede na pregled literature bi predvidevali naslednje možne scenarije preživetja v okolju: i) bakterije podvrste MAP v okolju sobivajo s sorodnimi mikobakterijami, ki jim lahko zagotavljajo mikobaktin; ii) MAP lahko koristi ksenosiderofore; iii) MAP privzema železo kot intracelularni parazit/simbiont okoljskih ameb z mehanizmom, ki je neodvisen od mikobaktina; iv) obstajajo povsem drugi mehanizmi kot npr. prehod v dormantno stanje in s tem kompenzacija primanjkljaja železa ali pa spreminjanje topnosti železa na račun anaerobnosti in nizkega pH. V okviru naše raziskave smo se osredotočili na distribucijo

bakterij podvrste MAP v okolici kmetij z okuženim govedom, ter skušali ugotoviti, kakšni tipi vzorcev korelirajo s prisotnostjo MAP in kakšne so možnosti za pridobivanje železa brez lastnih sideroforov v takšnih vzorcih. Določili smo tudi presek življenjskega okolja MAP z drugimi podvrstami *M. avium*, ki bi lahko zagotavljale manjkajoč siderofor. V istem okolju smo preverili tudi prisotnost ameb in možnost intracelularnega preživetja bakterij podvrste MAP, kot način, ki jim omogoča dolgoročno perzistenco v okolju, neodvisno od mikobaktina.

Homeostaza železa je ključna za normalno delovanje celice. V pogojih pomanjkanja železa mikobakterije aktivirajo različne mehanizme za pridobivanje in varčevanje železa, kar vpliva na globalni metabolizem celice (Bacon in sod., 2007). Takšne celice imajo lahko fenotipsko spremenjeno odpornost na antibiotike (Sritharan in sod., 2006). Ker je za makrofage značilna restrikcija železa s strani gostitelja, bi spremenjena odpornost na antibiotike v takšnih pogojih lahko imela vpliv na uspešnost zdravljenja infekcij z bakterijami podvrst MAH in MAP. Zato smo v okviru raziskave želeli ugotoviti, kako pomanjkanje železa vpliva na profil odpornosti na antibiotike pri MAH in MAP in kako se ta vpliv razlikuje med obema bakterijama, glede nato, da ima MAP drugačen metabolizem železa.

Postavili smo naslednje delovne hipoteze:

1. Dostopnost železa vpliva na ekspresijo genov za sintezo mikobaktina pri MAP, fenotipski odziv pa je okvarjen zaradi transkripcijskih ali post-transkripcijskih dogodkov.

2. Med posameznimi sevi MAP obstaja genetska variabilnost in ustaljenost v operonih za sintezo mikobaktina, zaradi česar se odzivi na dostopnost železa med sevi razlikujejo

3. MAP je v okolju lokalizirana znotraj fagocitnih ameb, ki ji omogočajo boljšo kompeticijo za nutriente, tudi železo, in tako omogočajo preživetje v okolju izven gostitelja.

4. Dostopnost železa vpliva na odpornost podvrst *M. avium* na antibiotike.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 GLAVNE ZNAČILNOSTI IN KLINIČNA VLOGA MIKOBAKTERIJ

Mikobakterije so pomembne predstavnice razreda *Actinobacteria*, ki trenutno vključujejo več kot 130 vrst zelo raznolikih mikroorganizmov, od saprofitskih okoljskih vrst, kot je *Mycobacterium smegmatis*, do oportunistično in obligatno patogenih vrst, kot so podvrste bakterije *M. avium* in *M. tuberculosis*, ki lahko povzročajo resne okužbe pri človeku in živalih. Za vse je značilna paličasta oblika, debela hidrofobna celična stena iz mikolnih kislin (in posledična acidorezistentnost) in kot za vse predstavnike po Gramu pozitivnih bakterij, visok delež gvaninskih/citozinskih baznih parov (61 do 70 %) (Turenne in sod., 2007; Vincent Lévy-Frébault in Portaels, 1992).

Medtem, ko se število obolelih za tuberkulozo (posledica okužbe z *M. tuberculosis*) na globalni ravni iz leta v leto zmanjšuje, predvsem na račun učinkovitih preventivnih ukrepov in napredka pri zdravljenju, se število obolelih zaradi okužbe z oportunistično patogenimi mikobakterijami povečuje (Falkinham, 2003; Horsburgh, 1991; Inderlied in sod., 1993). Razlog za porast je predvsem naraščanje števila oseb z oslabljenim imunskim sistemom, kot posledica imunskih bolezni (AIDS), kroničnih bolezni (pljuča, prebavni trakt), zdravljenja z imunosupresivnimi kemoterapevtiki (npr. pri rakavih obolenjih) in splošnega staranja prebivalstva (Falkinham, 2003; Löbermann in sod., 2012). Možnost okužbe pri takih ljudeh je zaradi široke razširjenosti teh mikobakterij v človeškem okolju izredno velika. Primer takšnih potencialno patogenih mikobakterij so poleg *M. kansasii*, *M. ulcerans* in *M. intracellulare* tudi podvrste bakterije *M. avium* (Kazda in sod., 2009).

2.2 PODVRSTE BAKTERIJE *Mycobacterium avium*

2.2.1 Primerjalna genomika in evolucija podvrst bakterije *M. avium*

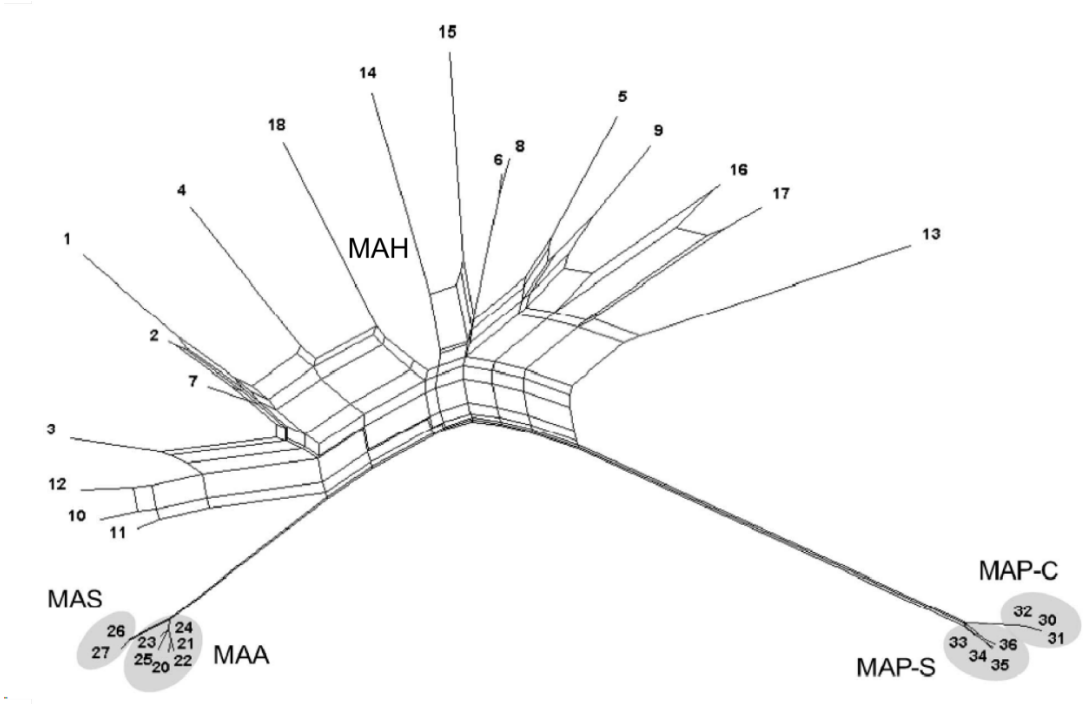
Primerjalna genomika na podlagi DNK hibridizacijskih študij, MLSA (*ang.* Multi Locus Sequence Analysis) in sekveniranih genomov kaže na veliko podobnost med podvrstami na ravni nukleotidnega zaporedja (>99 %), vendar pa se razlikujejo v prisotnosti ali odsotnosti določenih večjih polimorfnih odsekov (*ang.* LSP – large sequence polymorphism) in organizaciji genoma kot posledici rekombinacijskih dogodkov (inverzije, duplikacije) (Alexander in sod., 2009; Paustian in sod., 2008; Semret in sod., 2004; Wu in sod., 2006).Vse to določa izredno fenotipsko raznolikost med podvrstami, ki se kaže v hitrost rasti, v gostiteljih, pri katerih povzročajo infekcijo, specifičnih metabolnih poteh in nenazadnje virulenci. Trenutna klasifikacija ločuje med 4. podvrstami (Bartos in sod., 2006; Kazda in sod., 2009; Turenne in sod., 2007; Wu in sod., 2006):

i) ***Mycobacterium avium*** **podvrste** ***avium*** (MAA) povzroča mikobakteriozo pri različnih vrstah ptic, občasno tudi pri prašičih, govedu in človeku (Thorel in sod., 2001);
ii) ***Mycobacterium avium*** **podvrste** ***silvaticum*** (MAS) je najmanj raziskana, prvič izolirana iz tuberkuloznih lezij goloba grivarja (*Columba palumbus*) (Thorel in sod., 1990);
iii) ***Mycobacterium avium*** **podvrste** ***hominissuis*** (MAH) povzroča mikobakteriozo predvsem pri prašičih in človeku, redko pri govedu (Horan in sod., 2006; Kazda in sod., 2009);

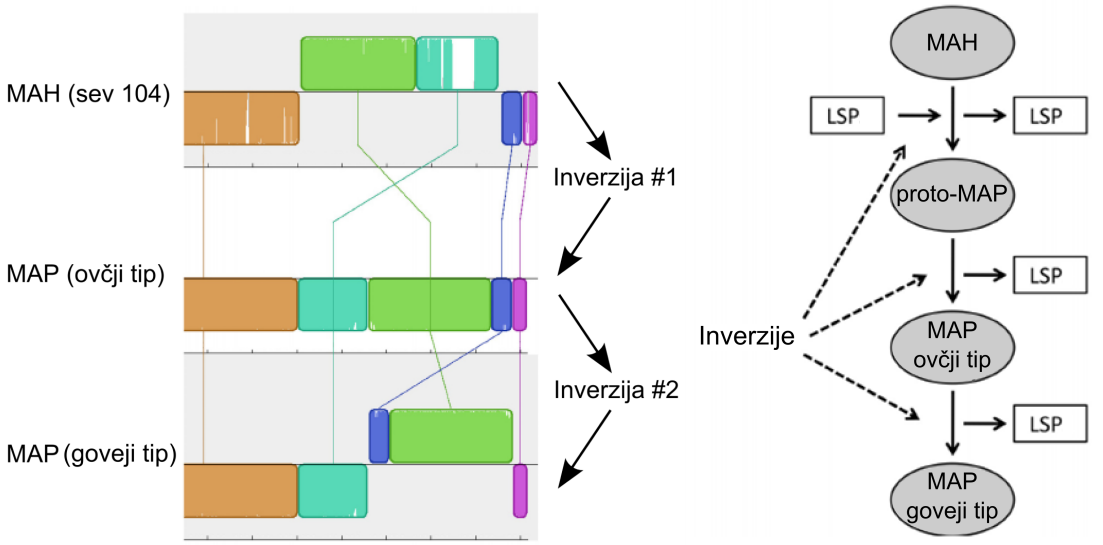
iv) ***Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis*** (MAP) povzroča paratuberkulozo pri prežvekovalcih (Johnejeva bolezen) in občasno drugih sesalcih, obstaja sum na vpletenost pri razvoju Crohnove bolezni pri človeku (Behr in Collins, 2010).

Diskriminacija med posameznimi podvrstami na molekularno-genetskem nivoju je mogoča na podlagi prisotnosti specifičnih insercijskih zaporedij (IS, *ang.* insertion sequence). Tako je prisotnost IS tipa *900* (IS*900*) značilna samo za bakterije podvrste MAP, IS*901* samo za bakterije podvrste MAA in MAS, IS*1245* pa je prisotna v genomih vseh podvrst *M. avium* razen MAS (Collins in sod., 1997). Omenjene IS se tako pogosto uporabljajo kot specifične tarče v reakcijah PCR za identifikacijo podvrst ter za namene detekcije in kvantifikacije v okolju z Real-time PCR (Bartos in sod., 2006; Kaevska in sod., 2011; Slana in sod., 2010). Ker število kopij IS v genomu bakterij podvrst *M. avium* variira, se uporabljajo tudi za namene genotipizacije znotraj podvrst (Collins in sod., 1997; Roiz in sod., 1995).

Filogenetske analize so pokazale, da genotipi bakterij podvrste MAH tvorijo ločeno skupino z veliko raznolikostjo v primerjavi z ostalimi podvrstami (Wu in sod., 2006). Filogenetska oddaljenost med bakterijami podvrst MAA in MAS je precej manjša kot med ostalimi podvrstami, zaradi česar tvorita skupno filogenetsko skupino, ločeno od bakterij podvrste MAP (Slika 1) (Turenne in sod., 2008). Primerjave polimorfizmov posameznih nukleotidov (*ang.* SNP – single nucleotide polymorphism) so pokazale precej manjši delež nesinonimnih nukleotidnih zamenjav v filogenetski skupini bakterij podvrste MAH kot bodisi v MAA/MAS ali MAP filogenetski skupini, kar kaže na večjo ustaljenost in evolucijsko starost genoma v filogenetski skupini bakterij podvrst MAH v primerjavi z bakterijami podvrst MAA, MAS in MAP (Turenne in sod., 2008). Sledenje preurejanju genoma preko delecij, insercij in inverzij med podvrstami je prav tako pokazalo, da je bakterija podvrste MAH najverjetneje prednik, iz katerega je potekla diverzifikacija po eni strani v bakterije podvrst MAA/MAS in po drugi strani v bakterije podvrste MAP, ki se je nadalje razvila v heterogeno skupino podvrst MAP tipa I in III (ovčji tip) in bolj homogeno skupino podvrst MAP tipa II (goveji tip) (Slika 2) (Bannantine in sod., 2012). Velja poudariti, da je evolucija genoma od bakterij podvrste MAH do bakterij podvrste MAP zaznamovana z insercijo kot prvim evolucijskim dogodkom, nato pa redukcijo genoma (MAH=5,48 Mbp, MAP=4,81 Mbp), kar je v skladu z evolucijo iz okoljskega mikroorganizma, kot so bakterije podvrste MAH, v bolj specializirane patogene mikroorganizme, kot so bakterije podvrste MAP (Alexander in sod., 2009; Bannantine in sod., 2012).



Slika 1: Filogenetsko drevo podvrst bakterije *Mycobacterium avium* (Turenne in sod., 2008: 2482)
MAP-C – bakterija podvrste MAP govejega tipa II; *MAP-S* – bakterija podvrste MAP ovčjega tipa I in III.



Slika 2: Predlagan potek evolucije genoma MAH do ovčjega (tip I in III) in govejega tipa (tip II) MAP (Bannantine in sod., 2012: 9)
Levo – potek evolucije preko genomskih preurejanj z inverzijami; *Desno* - shematski prikaz evolucije; *LSP* – polimorfizem daljših zaporedij.

2.2.2 *Mycobacterium avium* podvrste *hominissuis*

2.2.2.1 Splošne značilnosti bakterij podvrste MAH

Bakterije podvrste MAH so se dolgo časa obravnavala skupaj z bakterijami podvrste MAA, šele v zadnjem desetletju so se začele obravnavati ločeno, predvsem na podlagi opažanj, da se genotipizacijski profili na IS*1245* pri *M. avium* podvrstah, izoliranih iz človeka in prašiča, močno razlikujejo od tistih iz ptic. Poleg tega človeški/prašičji izolati ne vsebujejo IS*901*, značilne za ptičje izolate, ter so sposobni rasti v širokem temperaturnem območju od 18 do 45 °C (Kazda in sod., 2009; Mijs in sod., 2002). Izmed vseh podvrst bakterije *M. avium* so bakterije MAH najbolje sposobne rasti izven gostitelja, v laboratorijskih pogojih pa rastejo brez posebnih zahtev in precej hitreje kot bakterije podvrst MAP in MAS (Kazda in sod., 2009). Zanimiv in značilen pojav pri bakterijah podvrste MAH je reverzibilno fenotipsko preklapljanje, ki se kaže v razvoju različnih morfologij klonalne populacije bakterij. Različni morfotipi se med seboj razlikujejo glede na sestavo celične stene, virulenco in odpornost na antibiotike (Blumenthal in sod., 2005; Cangelosi in sod., 2006; Reddy in sod., 1996).

2.2.2.2 Epidemiologija bakterij podvrste MAH

Bakterije podvrste MAH najpogosteje povzročajo infekcije pri prašičih in človeku, vse več pa je poročil o izolaciji tudi iz drugih sesalcev, predvsem divjadi, konjev in psov ter iz tropskih ptic (Campora in sod., 2011; Dagleish in sod., 2012; Glawischnig in sod., 2006; Shitaye in sod., 2009). Infekcija z bakterijo podvrste MAH se običajno ne prenaša med ljudmi, kot tudi ne iz živali na ljudi. Primarni vir okužbe je okolje, predvsem vodni viri, kontaminirana zemlja in aerosoli (Du Moulin in sod., 1988; Reed in sod., 2006; Tobin-D'Angelo in sod., 2004; Von Reyn in sod., 1994). Sistemske infekcije z bakterijami podvrste MAH pri človeku se pojavljajo v povezavi z oslabljenim imunskim sistemom. Prevalenca pri bolnikih z AIDS-om se giblje med 15 in 24 %, kar prispeva k povišanju smrtnosti v tej skupini ljudi (Horsburgh, 1991; Horsburgh in sod., 1994). Od vseh infekcij z netuberkuloznimi mikobakterijami (NTM) pri teh bolnikih jih je kar 98 % posledica infekcije z bakterijami podvrste MAH, *post mortem* histopatološke analize pa so pokazale prisotnost infekcije z bakterijami podvrste MAH v več kot 50 % primerov (Falkinham, 2003; Wallace in Hannah, 1988). Infekcije z bakterijami MAH se pojavljajo tudi pri ljudeh, ki jemljejo imunosupresante tekom kemoterapije pri rakavih obolenjih ali po transplantaciji organov in tkiv (Doucette in Fishman, 2004; Snydman in sod., 2010). Povišano tveganje predstavljajo tudi kronične pljučne bolezni, kot je kronična obstruktivna pljučna bolezen (KOPB), kajenje in dolgotrajna izpostavljenost prašnim delcem (npr. v rudnikih, tovarnah, na kmetijah, itd.) (Falkinham, 2003). Pljučne infekcije z bakterijami podvrste MAH se pojavljajo tudi pri starejših ljudeh brez predispozicije, medtem ko pri zdravih otrocih te bakterije lahko povzročajo cervikalni limfadenitis (vnetje limfnih žlez na vratu) (Bruijnesteijn van Coppenraet in sod., 2008; Prince in sod., 1989).

2.2.2.3 Patogeneza bakterij podvrste MAH

Pri človeku poteka okužba z bakterijami podvrste MAH preko respiratornega ali gastrointestinalnega trakta, od koder se lahko razširi na druge organe in povzroča sistemsko infekcijo (Inderlied in sod., 1993). V črevesju mikobakterije prodrejo skozi

črevesni epitelij preko M celic in enterocit do črevesnega limfatičnega tkiva (Peyer-jeve plošče), kjer jih fagocitirajo makrofagi in dendritične celice (Bermudez in sod., 2010; Mohagheghpour in sod., 2000). Fagocitoza poteče preko interakcije mikobakterij z različnimi receptorji na površini makrofagov, kot so receptorji komplementa 3 (CR3), fibronektinski, manozni receptorji, in v povezavi s protitelesi, receptorji Fc-γ (Bermudez in sod., 1991; Ernst, 1998). Fagocitirane mikobakterije v makfrofagih preprečujejo normalno zorenje fagosomov, v katerih se nahajajo, s tem da preprečujejo zakisanje in zlitje s proteolitičnimi encimi lizosoma, med drugim z manipulacijo aktinskega citoskeleta, ki vpliva na promet in razvrščanje intracelularnih komponent (Crowle in sod., 1991; Guérin in de Chastellier, 2000; Oh in Straubinger, 1996). Kljub temu se fagosomi z mikobakterijami zlivajo z drugimi zgodnjimi endosomskimi vezikli, ki sodelujejo pri recikliranju in vzdrževanju makrofagov, kar jim najverjetneje omogoča dostop do nutrientov in mineralov (Russell in sod., 1996). Infekcija z mikobakterijami sproži v prvi fazi nespecifični imunski odziv preko signaliziranja s Toll-podobnimi receptorji (TLR), ki so zasidrani v membranah makrofagov in prepoznajo strukturne elemente na površini mikobakterij. TLR signalna kaskada v makrofagih povzroči sproščanje različnih kemokinov in citokinov, kot so tumor nekrosis faktor alfa (TNF-α), vnetni interleukini (IL-1, IL-2, IL-12, itn.), spodbujevalni dejavnik rasti kolonij granulocitov in makrofagov (GM-CSF) ter interferon gama (IFN-γ) (Appelberg in sod., 1994; Lien in sod., 1999; Smith in sod., 1997). Ti nadalje povzročijo mobilizacijo celičnega imunskega odziva tipa 1 (T_H1), ki vključuje aktivacijo CD^{4+} T celic pomagalk in T celic ubijalk, naravnih celic ubijalk in makrofagov (Appelberg, 2006; Appelberg in sod., 1994; Inderlied in sod., 1993). Aktivacija makrofagov s TNF-α je ključnega pomena za baktericidno aktivnost makrofagov proti intracelularnim mikobakterijam, ki se izraža s produkcijo dušikovega oksida (NO) in reaktivnih kisikovih spojin (ROS) ter restrikcijo esencialnih mineralov (npr. železa) in nutrientov (Schaible in sod., 1998). Pri bolnikih z AIDS je mreža cito- in kemokinskega signaliziranja okvarjena, kar se kaže v povečani produkciji protivnetnega IL-10, ki zavira T_H1 imunski odziv (Müller in sod., 1998). Zaradi tega pride do neustrezne aktivacije celičnega imunskega odziva in posledično intracelularnega razmnoževanja mikobakterij ter širjenja infekcije po limfi in krvi do jeter, vranice in kostnega mozga, lahko pa tudi do drugih organov. Nasprotno pri imunokompetentnih ljudeh na mestih infekcije nastanejo vnetni granulomi iz aktiviranih makrofagov, T limfocitov, fibroblastov in epitelijskega tkiva, ki omejijo nadaljnje širjenje infekcije, dokler imunski odziv ne uniči mikobakterij (Horsburgh, 1999). Tvorba granulomov je inducirana s sproščanjem TNF-α in IFN-γ iz CD^{4+} T celic (Hänsch in sod., 1996), kar kaže na možen vzrok pogostejšega pojavljanja sistemske infekcije z bakterijami podvrste MAH pri AIDS bolnikih z znižano koncentracijo CD^{4+} T celic ($<10/mm^3$) (Inderlied in sod., 1993).

Zdravljenje infekcij povzročenimi z bakterijami podvrste MAH je zelo težavno zaradi izredne intrinzične odpornosti na antibiotike v primerjavi z bakterijami vrste *M. tuberculosis*, kar je značilno za večino okoljskih mikobakterij. Tako so bakterije podvrste MAH odporne na terapevtske koncentracije večine antituberkuloznih antibiotikov prve izbire, kot so isoniazid, etambutol, pirazinamid, in delno na rifampicin. Vzrok za intrinzično odpornost je predvsem slaba prepustnost mikobakterijske celične stene, sestavljene iz debele plasti peptidoglikanov in mikolnih kislin, ki je pri bakterijah podvrste MAH še dodatno obdana z glikopeptidi (Inderlied in sod., 1993; Jarlier in Nikaido, 1994). Poleg tega k rezistenci prispeva tudi prisotnost in aktivnost številnih efluksnih črpalk, ki aktivno prečrpavajo antibiotike iz celice in preprečujejo njihovo delovanje na intracelularne tarče (Rodrigues in sod., 2009; Rossi in sod., 2006; Viveiros in sod., 2003). Beta laktamski antibiotiki so v primeru bakterij podvrste MAH popolnoma neučinkoviti

zaradi prisotnosti inducibilnih beta-laktamaz, ki jih najdemo pri večini mikobakterij (Flores in sod., 2005; Nampoothiri in sod., 2008). Izbiro ustreznega antibiotika in režima zdravljenja ovira tudi slaba korelacija med *in vitro* določeno občutljivostjo na antibiotike in dejanskim *in vivo* odzivom na zdravljenje (Sison in sod., 1996). Izjema sta antibiotika iz skupine makrolidov, klaritromicin in azitromicin, ki sta trenutno najbolj učinkovita pri zdravljenju infekcij z bakterijami podvrste MAH pri človeku. Poleg tega sta v kombinaciji z drugimi antibiotiki delno učinkovita tudi amikacin in streptomicin ter fluorokinoloni, kot npr. ciprofloksacin in levofloksacin (Rastogi in Labrousse, 1991; Yajko in sod., 1996).

2.2.3 *Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis*

2.2.3.1 Splošne značilnosti bakterij podvrste MAP

V primerjavi z bakterijami podvrste MAH, bakterije podvrste MAP rastejo precej počasneje v *in vitro* pogojih, poleg tega za rast potrebujejo dodatek mikobaktina (siderofor). So obligatni patogeni, ki se ne zmorejo razmnoževati izven gostitelja kot bakterije podvrste MAH (Kazda in sod., 2009). Za genom bakterij podvrst MAP je značilna prisotnost več kopij IS*900*, ki se uporablja za identifikacijo, RFLP tipizacijo in detekcijo (Bartos in sod., 2006; Pavlik in sod., 1999). Prvotna klasifikacija glede na RFLP analize je seve podvrst MAP razdelila na 3 tipe: i) kravji tip (tip C; *ang.* cattle), ii) ovčji tip (tip S; *ang.* sheep) in iii) vmesni tip (tip I; *ang.* intermediate) (Collins in sod., 1990). Z naraščanjem števila genotipizacijskih študij, novih genotipizacijskih tehnik, ter sekveniranih genomov se je uveljavila nova klasifikacija, ki deli podvrste MAP na: i) heterogeno skupino ovčjega tipa (tip S, vključuje tipe I in III, prej tip S in I) in ii) bolj homogeno skupino govejega tipa (tip C, prej tip II) (Castellanos in sod., 2009b; Castellanos in sod., 2007; De Juan in sod., 2006a; Sevilla in sod., 2007). Kljub tej klasifikaciji, S in C tipi niso omejeni na ovčje ali goveje gostitelje, temveč se oba tipa lahko pojavljata tudi pri drugih prežvekovalcih. Poleg genotipskih razlik se tipa S in C razlikujeta v rastnih karakteristikah (De Juan in sod., 2006b), imunskem odzivu v govejih makrofagih (Janagama in sod., 2006), transkripcijskih odzivih človeških makrofagov (Motiwala in sod., 2006) in v metabolizmu železa (Janagama in sod., 2010b). Za S tip MAP je značilna izredno počasna rast, ki v obstoječih formulacijah gojišč potrebuje od 4 do 12 mesecev do pojava vidnih kolonij, medtem ko C tip MAP zraste že v 4 do 16 tednih (Behr in Collins, 2010).

2.2.3.2 Epidemiologija bakterij podvrste MAP

Sevi bakterij podvrste MAP tipa I so večinoma izolirani iz ovc, kar kaže na morebitno preferenco za te gostitelje (Cousins in sod., 2000). Za razliko imajo sevi tipa II širšo preferenco za gostitelje in so jih do sedaj izolirali iz različnih vrst prežvekovalcev, tako divjih kot udomačenih, kot tudi iz drugih sesalcev, ptic in nekaterih primatov (Anderson in sod., 2007; Corn in sod., 2005; Zwick in sod., 2002). Tipa II je tudi večina izolatov iz goveda in pa iz bolnikov s Crohnovo boleznijo (Ghadiali in sod., 2004; Whittington in sod., 2000). Bakterije podvrste MAP se med živalmi prenašajo preko oralno-fekalne poti, neposredno z zaužitjem izločkov okuženih živali (feces, mleko, kolostrum) (Nielsen in sod., 2008) ali posredno z zaužitjem hrane ali vode, ki so bili kontaminirani s fecesom okužene živali (Behr in Collins, 2010). Mlajše živali (teleta <6 mesecev) imajo višje

tveganje za infekcijo, ki napreduje hitreje kot pri starejših živalih, verjetno tudi kot posledica nižje infektivne doze v primerjavi s starejšimi živalmi in slabše razvitega imunskega sistema (Larsen in sod., 1975; Windsor in Whittington, 2010). Inkubacijska doba je odvisna od količine zaužitih organizmov v časovnem obdobju in se giblje od nekaj mesecev do več let, natančno vrednost pa je težko določiti, saj se govedo pogosto prej izloči iz črede (zakol), preden infekcija pride do izraza (Whittington in Sergeant, 2001). Verjetnost za napredovanje infekcije in pojav kliničnih znakov bolezni se poveča v obdobjih imunske oslabljenosti, kot je brejost, telitev, laktacija, slabi nutricijski in higienski pogoji ter drugi stresorji (Ott in sod., 1999). Ocene prevalence bakterij podvrst MAP pri govedu in drugih prežvekovalcih geografsko zelo nihajo in so odvisne od metode detekcije. Ocene na ravni čred v svetu, glede na teste ELISA iz seruma, se gibljejo od 30 do 50 % v rejah krav mlekaric (več kot 50 % z metodo fekalne kulture) in od 8 do 54 % v rejah pitancev, na ravni posamezne živali pa je seroprevalenca npr. v ZDA od 1.2 do 9,4 % in 0,4 do 8 % pri reji krav mlekaric in reji pitancev. Prevalenca med kozami in ovcami na ravni posameznih živali se giblje med 0,3 do 3,5 % v Evropi in med 1,5% do 39 % na Novi Zelandiji (Behr in Collins, 2010). Paratuberkuloza pri prežvekovalcih povzroča velike ekonomske izgube, predvsem zaradi nižje produkcije mleka, nižje vrednosti ob zakolu, pogostejših zakolov, povečane smrtnosti, daljših intervalov med telitvami, zmanjšane rodnosti ter visokih stroškov diagnostike in zdravljenja (Lombard in sod., 2005; Ott in sod., 1999; Richardson in More, 2009).

Prenos sevov med vrstami je redek in naj ne bi predstavljal večjega tveganja v naravnih pogojih. Ovčji sevi tipa I redko povzročajo infekcije pri govedu in drugih prežvekovalcih (Moloney in Whittington, 2008), medtem ko goveji sevi tipa II ne povzročajo infekcij v avstralski populaciji ovc (Whittington in sod., 2000), občasne infekcije s tem tipom pa se pojavljajo v evropskih populacijah ovc (Stevenson in sod., 2009). Bakterije podvrst MAP govejega tipa II se bolje razmnožujejo v govejih makrofagih kot bakterije podvrst MAP ovčjega tipa I, poleg tega pri govedu pro-vneten imunski odziv, ki je potreben za uspešno omejitev infekcije, sproži le ovčji tip, kar kaže na razlog, zakaj ovčji sevi redko povzročajo bolezen v govejem gostitelju (Janagama in sod., 2006; Motiwala in sod., 2006). Podobno goveji tipi bakterij podvrst MAP v ovcah povzročajo drugačne in predvsem milejše histopatološke znake od ovčjih tipov (Verna in sod., 2007).

Bakterije podvrste MAP se omenjajo kot možen zoonotski agens, ki naj bi pri človeku povzročal Crohnovo bolezen. Gre za gastrointestinalno vnetno bolezen, ki je simptomatsko podobna paratuberkulozi pri prežvekovalcih. Trenutno se mnenja razhajajo in medicinska stroka nasplošno ne sprejema hipoteze o vpletenosti bakterij podvrste MAP v razvoj bolezni, temveč to bolezen označuje kot posledico genetsko pogojene imunske pomanjkljivosti oz. preobčutljivosti (Folwaczny in sod., 2003; Sartor, 2006). Dileme se pojavljajo predvsem zaradi nekonzistentnih rezultatov številnih študij, ki skušajo dokazati prisotnost bakterij podvrste MAP v Crohnovih bolnikih (Behr in Kapur, 2008). Na ravni DNK je več študij pokazalo pogostejšo prisotnost bakterij podvrste MAP v biopsijah črevesa (Autschbach in sod., 2005; Bull in sod., 2003) in v krvi (Mendoza in sod., 2010; Naser in sod.) bolnikov s Crohnovo boleznijo kot pri zdravih kontrolah, DNK bakterij podvrste MAP pa so zaznali celo v materinem mleku bolnic s to boleznijo (Naser in sod., 2000). Redkejša pa so poročanja o pozitivni korelaciji na podlagi kultur in mikroskopskih analiz iz tkiv. Zagovorniki povezave argumentirajo, da razlog za to tiči v neenakomerni porazdelitvi bakterij podvrste MAP vzdolž gastrointestinalnega trakta in poskusu dokaza prisotnosti teh bakterij iz napačnih vzorcev tkiv. Večina študij za dokaz prisotnosti bakterij podvrste MAP namreč uporablja biopsije črevesne stene, medtem ko se patologija

Crohnove bolezni razteza precej globlje, v mezenterični endotelij in limfatični sistem (Pierce, 2009b). Dokazovanje prisotnosti bakterij podvrste MAP z mikroskopskimi analizami z barvanjem po Ziehl-Neelsen-u naj bi bilo nezanesljivo, saj je so te bakterije v človeku (predvsem v krvi) pogosto v obliki sferoplastov (brez celične stene), ki po spiranju s kislino ne zadržijo karbol fuksina kot je značilno za ostale mikobakterije (Naser in sod., 2004; Wall in sod., 1993). Nenazadnje tudi še ni razjasnjeno, ali je pogostejša prisotnost bakterij podvrste MAP pri Crohnovih bolnikih povezana vzročno ali posledično z napredovanjem bolezni. Ostali razlogi proti vlogi teh bakterij pri Crohnovi bolezni so i) odsotnost povečanega tveganja za razvoj bolezni pri kmetih in veterinarjih, ki so v stiku z okuženimi živalmi, ii) neučinkovito zdravljenje bolnikov z anti-mikobakterijskimi antibiotiki in iii) uspešna uporaba inhibitorjev TNF-α pri zdravljenju bolnikov se ne sklada s pričakovanim učinkom v primeru infekcije z mikobakterijami, saj inhibicija TNF-α zavira vnetni imunski odziv, ki običajno vodi v nekontrolirano razmnoževanje mikobakterij in napredovanje bolezni (Behr in Collins, 2010).

2.2.3.3 Patogeneza bakterij podvrste MAP v primerjavi z bakterijami podvrste MAH

Bakterije podvrste MAP vstopajo v gostitelja skoraj izključno preko gastrointestinalnega trakta. Podobno kot bakterije podvrste MAH tudi MAP prehajajo skozi črevesni epitelij preko enterocit in M celic do *lamine proprie*, kjer jih fagocitirajo makrofagi (Harris in Barletta, 2001). Inhibicija zorenja in zakisanja fagosomov jim omogoča, da se intracelularno razmnožujejo (Kuehnel in sod., 2001). Imunski odziv je posledica kompleksne interakcije med bakterijo in gostiteljem in variira v odvisnosti od seva in tipa bakterije podvrste MAP ter imunskega stanja gostitelja (Janagama in sod., 2006; Kabara in sod., 2010; Motiwala in sod., 2006; Weiss in Souza, 2008). Kot za infekcije z bakterijami podvrste MAH sta tudi za bakterije podvrste MAP značilni dve vrsti imunskega odziva: celični imunski odziv (T_H1) in humoralni imunski odziv (T_H2). T_H1 je zaznamovan s povišano produkcijo vnetnih citokinov (predvsem IL-2, IFN-γ in TNF-α) in formacijo nekrotičnih tuberkuloidnih granulomov, ki jih sestavljajo predvsem T celice in redki mikobakterijski bacili. T_H2 odziv po drugi strani je posledica inhibicije produkcije vnetnih citokinov (predvsem z IL-10) in aktivacijo humoralnega odziva, kar povzroči nastanek granulomov z velikimi količinami mobiliziranih makrofagov, nevtrofilcev in mikobakterij (Smeed in sod., 2007). V primeru bakterij podvrste MAH, T_H1 ščiti pred širjenjem infekcije in je običajno povezan z uspešno eliminacijo infekcije pri imunokompetentnih ljudeh, medtem ko je T_H2 odziv povezan z diseminacijo infekcije pri imunokomprimiranih bolnikih (Horsburgh, 1999; Inderlied in sod., 1993). Nasprotno pri infekciji z bakterijami podvrste MAP pri prežvekovalcih T_H1 ne ščiti pred napredovanjem infekcije. Pri govedu sta vnetje in T_H1 imunski odziv značilna le za prvo stopnjo (v subklinični fazi) razvoja bolezni, sledi mu T_H2 odziv (lahko šele čez več let), ki je neučinkovit pri kontroli infekcije in običajno zaznamuje začetek pojavljanja kliničnih znakov bolezni (Stabel, 2000). Pri ovcah se paratubekuloza lahko kaže v obliki T_H1 ali T_H2 inducirane granulomatozne histopatologije, in obe lahko vodita do razširjene infekcije (Clarke in Little, 1996).

Celotni potek infekcije z bakterijami podvrste MAP pri govedu se lahko razdeli na štiri faze. V prvi fazi infekcija poteka tiho, brez zunanjih fizioloških znakov, in lahko traja več let. V tej fazi se bakterije počasi širijo po gastrointestinalnem traktu in regionalnih limfnih žlezah, zadnje raziskave kažejo, da se MAP v fecesu lahko pojavlja že v tej fazi (Logar in sod., 2012). V drugi fazi se koncentracije bakterij v črevesnih tkivih povečajo, prav tako se začne močnejše izločanje bakterij v fecesu. Tretja in četrta faza sta zaznamovani s progresivnim slabšanjem simptomov infekcije. Degenerativne poškodbe črevesja kot

posledica infekcije prispevajo k slabši absorpciji nutrientov in postopni izgubi mase. Pojavlja se kronična diareja in zmanjšana produkcija mleka. V zadnji fazi so živali popolnoma podhranjene, dehidrirane in izčrpane, kar je običajno razlog za izločitev iz črede oziroma zakol (Behr in Collins, 2010).

Primerjave imunskih odzivov makrofagov ob izpostavljenosti različnim podvrstam bakterije *M. avium* so pokazale, da je aktivacija vnetnega imunskega odziva odvisna od specifike mikobakterij. Viden je konsistenten trend supresije vnetnega imunskega odziva makrofagov iz gostitelja, za katerega je določena *M. avium* podvrsta specializirana; npr. infekcija človeških in prašičjih makrofagov z bakterijo podvrste MAH povzroči višjo produkcijo proti-vnetnega IL-10 in supresijo vnetnih citokinov in kemokinov v primerjavi z infekcijo teh makrofagov z bakterijo podvrste MAA (Stepanova in sod., 2012; Thegerström in sod., 2012). Enako so pri infekciji govejih makrofagov z bakterijo podvrste MAP opazili povišane koncentracije IL-10 in znižane koncentracije vnetnih citokinov IL-12, IFN-γ in TNF-α ter nasplošno šibkejši imunski odziv v primerjavi z infekcijo z bakterijo podvrste MAA (Murphy in sod., 2007; Weiss in sod., 2002).

Primerjava med imunskimi odzivi na infekcijo z bakterijami podvrst MAP, MAH in MAA na modelu mišjih makrofagov je pokazala višji vnetni odziv pri bakterijah podvrste MAH in MAA kot pri MAP, kar kaže na možnost, da bakterije podvrste MAP specifično zavirajo vnetni odziv gostitelja (Basler in sod., 2008).

Zdravljenje okužbe z bakterijami podvrste MAP z antibiotiki je redko, predvsem zaradi neekonomičnosti in slabe učinkovitosti. Poleg tega je uporaba antibiotikov pri živalih, namenjenih za produkcijo hrane za človeka, prepovedana in zahteva začasno izločitev zdravljene živali iz črede. Antibiotike se uporablja le v primeru živali z visoko vrednostjo. V zadnjih časih je bolj aktualen razvoj na področju preventivnega zdravljenja s cepivi ter sama kontrola širjenja infekcije na farmah in med farmami, kot je redno testiranje goveda, izločanje okuženega goveda, hitrejša ločitev telet od krav (zaradi večje dovzetnosti telet za okužbo) (Behr in Collins, 2010; Emery in Whittington, 2004). Redke študije o občutljivosti MAP na antibiotike so v glavnem povezane z morebitno vlogo MAP pri Crohnovi bolezni pri človeku. MAP kaže podobno visoko odpornost na antibiotike kot MAH in prav tako kaže *in vitro* občutljivost na makrolide (azitromicin, klaritromicin), fluorokinolone (ciprofloksacin, levofloksacin) ter rifampicin (Chiodini, 1990; Krishnan in sod., 2009; Zanetti in sod., 2006). Na MAP delujejo bakteriostatično tudi tiopurinski imunosupresivi, ki se pogosto uporabljajo pri lajšanju simptomov Crohnove bolezni, kar morebiti zapolnjuje eno izmed vrzeli v hipotezi o MAP kot etiološkem dejavniku te bolezni (Shin in Collins, 2008).

2.2.4 Ekologija podvrst bakterije *Mycobacterium avium*

2.2.4.1 Fiziološke predispozicije mikobakterij

Fiziologija mikobakterij sama po sebi nakazuje na potencialno visoko obstojnost v različnih okoljskih pogojih. Debela, težko prepustna in z voski bogata celična stena daje mikobakterijam zaščito pred vrsto okoljskih stresorjev (Jarlier in Nikaido, 1994). Prepustnost celične stene je relativno nizka, še zlasti za hidrofilne molekule, zaradi česar je povišana odpornost na antibiotike in okoljske toksine, a hkrati zmanjšan pretok nutrientov. Slednje prispeva k počasni rasti mikobakterij, kar jim dodatno omogoča prilagajanje na spremenljive okoljske pogoje (Brennan in Nikaido, 1995). Hidrofobnost celične stene jim

omogoča tudi učinkovito pritrjanje na podlage, zaradi česar se bogatijo v biofilmih, kjer so dodatno zaščitene pred neugodnimi okoljskimi dejavniki (Schulze-Röbbecke in sod., 1992). Zaradi hidrofobnosti se razporejajo in koncentrirajo tudi na meji zrak-voda, npr. na zračnih mehurčkih, ki potujejo na površine vodnih teles. To jim nadalje omogoča aerosolizacijo in širjenje na daljše razdalje s površinskimi zračnimi tokovi (Parker in sod., 1983; Wendt in sod., 1980). Mikobakterije so tudi zelo odporne na visoke temperature in tolerirajo relativno visoka nihanja v pH in temperaturi, rastejo lahko v aerobnih in mikroaerofilnih ter preživijo v anaerobnih pogojih (Kazda in sod., 2009). Ob pomanjkanju kisika ali nutrientov lahko preidejo v dormantno fazo, kjer se razmnoževanje ustavi, ohrani pa se minimalna produkcija ATP, potrebna za preživetje (Archuleta in sod., 2005; Wayne in Hayes, 1996). Celica lahko ostane v tej fazi vsaj eno leto, kar vsekakor prispeva k perzistenci mikobakterij v različnih okoljih (Whittington in sod., 2004).

2.2.4.2 Ekologija bakterij podvrste MAH

Bakterije podvrste MAH so zelo razširjene v okolju in so izmed vseh podvrst bakterij *M. avium* najbolje prilagojene za ekstracelularno preživetje in razmnoževanje. Okolje je glavni rezervoar za infekcije s temi bakterijami pri imunokomprimiranih ljudeh, zaradi česar sta izpostavljenost in tveganje za te ljudi velika (Meissner in Anz, 1977). Raste v temperaturnem območju med 10 in 45 °C, viabilna pa je tudi pri nižjih temperaturah (George in sod., 1980). Ustreza ji pretežno kislo območje (pH 4-7), kar ji pride prav tudi za preživetje v fagosomu (pH 5-6) (Portaels in Pattyn, 1982). Rast je stimulirana v prisotnosti huminskih in fulvičnih kislin, ki so značilne za vlažne in zakisane prsti npr. v močvirjih, tajgah, na šotnih barjih ali območjih preraščenih z mahovi, zato lahko na takšnih področjih pričakujemo povišano število bakterij podvrste MAH v prsti (Kirschner in sod., 1999). Takšne pogoje najdemo npr. na Finskem, kjer je površinska plast prsti bogata z bakterijami podvrste MAH in frekvenca infekcij s temi bakterijami med bolniki z AIDS relativno visoka (Katila in sod., 1995). Šota se pogosto uporablja za pripravo zemlje za lončnice. Aerosoli, ki nastajajo ob prelaganju in stresanju zemlje so lahko vir okužbe z bakterijami podvrste MAH pri ljudeh (De Groote in sod., 2006). Ljudje, ki poklicno rokujejo s prstjo, imajo prav tako večje tveganje za okužbo (Reed in sod., 2006). Šota se občasno uporablja tudi kot dodatek h krmi za prašiče in je lahko pomemben vir infekcije pri teh živalih, zlasti mlajših (< 2 meseca) (Matlova in sod., 2005). Bakterije podvrste MAH se v prsti nahajajo tudi v rizosferi in laboratorijski poskusi na več rastlinah so pokazali njihovo prisotnost v višjih delih rastlin, kamor naj bi domnevno potovale z osmotskim tlakom skozi poškodovane dele korenin (Behr in Collins, 2010; Kauker in Rheinwald, 1972; Pribylova in sod., 2011).

Poleg prsti je pogost vir bakterij podvrste MAH tudi voda, kjer pa niso le kontaminacija, kot posledica spiranja površin, temveč so sposobne v različnih vodnih okoljih tudi preživeti in se razmnoževati (George in sod., 1980). Prisotne so v sladkih površinskih in odpadnih vodah, a le redko v slanih vodah, saj so koncentracije NaCl nad 1,5 % inhibitorne za rast (George in sod., 1980). Drugi faktorji, ki korelirajo s prisotnostjo mikobakterij v površinskih vodah so nizek pH, nizke ravni raztopljenega kisika, visoke koncentracije organskih snovi in visoke koncentracije železa, aluminija, bakra, kobalta ter kroma (Iivanainen in sod., 1993). Zaidejo lahko tudi v vodovodne distribucijske sisteme, kjer se zaradi hidrofobnosti pripenjajo na stene cevi in tvorijo biofilme (Vaerewijck in sod., 2005). Zato je pri analizi vodovodnih sistemov za prisotnost bakterij podvrste MAH pomembno vzorčiti biofilme, kjer se nahaja večina celic. V biofilmu so mikobakterije zaščitene pred zunanjimi vplivi, tako fizično kot fenotipsko, kar jim poleg intrinzične

odpornosti na baktericidne snovi omogoča zaščito pred kloriranjem in drugimi dezinfekcijskimi sredstvi (Steed in Falkinham, 2006; Taylor in sod., 2000). To jim daje kompeticijsko prednost pred drugimi mikroorganizmi ter omogoča razrast v biofilmu (Norton in sod., 2004). Zaradi luščenja biofilmov se bakterije podvrste MAH sproščajo v vodno telo in so pomemben vir infekcij pri ljudeh in živalih. Ugotovili so, da se bakterije podvrste MAH koncentrirajo v biofilmih ročk za tuširanje in da vdihavanje aerosolov, ki nastanejo pri pršenju kontaminirane vode, lahko povzroča pljučne infekcije (Falkinham in sod., 2008; Feazel in sod., 2009). Podoben vir infekcije, zaradi aerosolizacije kontaminirane vode so lahko slabo vzdrževani bazeni in vroče peneče kopeli (Lumb in sod., 2004). Še zlasti nevarna je prisotnost teh bakterij v toplih vodih vodovodnih sistemov v bolnišnicah, kjer je povečano število imunokomprimiranih ljudi s povišanim tveganjem za infekcijo z bakterijami podvrste MAH (Tobin-D'Angelo in sod., 2004).

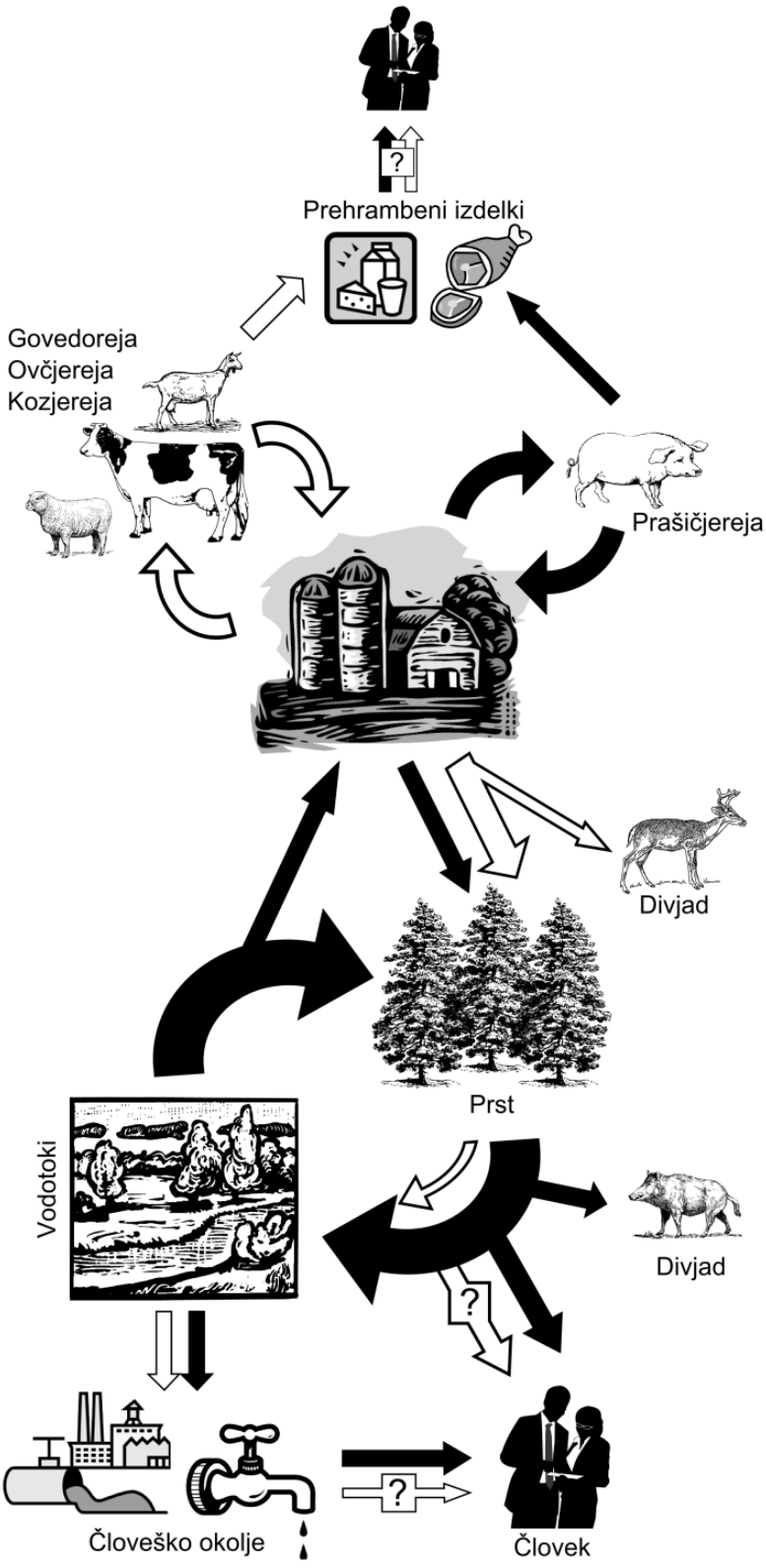
H kroženju bakterij podvrste MAH v okolju pomembno prispeva prisotnost mikobakterij v fecesu okuženih živali. Feces na prašičjih farmah se običajno zbira v obliki gnojnice, ki se po večmesečni fermentaciji v rezervoarjih uporabi kot gnojilo. Bakterije podvrste MAH lahko preživijo v gnojnici dalj časa in se z gnojenjem prenesejo na kmetijske površine, ki prvotno niso bile kontaminirane s temi bakterijami. Pridelki s takih površin ali paša živine na takšnih površinah ter spiranje v vodna telesa lahko prispeva k širjenju infekcij z bakterijami podvrste MAH (Slika 3) (Behr in Collins, 2010; Fischer in sod., 2003).

2.2.4.3 Ekologija bakterij podvrste MAP

Bakterije podvrste MAP naj ne bi bile sposobne razmnoževanja v okolju tako kot bakterije podvrste MAH, kar naj bi domnevno bilo tudi zaradi okvarjenega sistema pridobivanja železa (Kazda in sod., 2009). Rast bakterij podvrste MAP je *in vitro* namreč odvisna od eksogeno dodanega mikobaktina. Posledično je prisotnost v okolju večinoma vezana na kontaminacijo s fecesom okuženih živali. Količina bakterij podvrste MAP v fecesu posamezne krave je odvisna od stopnje infekcije in se deli na nizko (<300 cfu/g), srednje (300-3000 cfu/g) in visoko stopnjo kontaminacije (>3000 cfu/g) (Van Schaik in sod., 2003). Nekatere krave imajo lahko izjemo visoko stopnjo kontaminacije fecesa (>10^6 cfu/g) in lahko poglavitno prispevajo h kontaminciji ožjega in širšega okolja ter širjenju infekcije znotraj črede. Znotraj hleva so najpogosteje kontaminirana tla staje, skupni hodniki in kanali odvajane gnojnice (Raizman in sod., 2004; Smith in sod., 2011). Prisotnost teh bakterij so zaznali tudi v aerosolih in posedenem prahu 3 m od tal in v zračnikih hleva, na tleh v laktacijskem in telitvenem prostoru. Pozitivna so običajno tudi odlagališča gnoja, rezervoarji za gnojnico in sredstva za razvoz gnojnice (Eisenberg in sod., 2010a; Eisenberg in sod., 2010b; Pillars in sod., 2009; Raizman in sod., 2004). V primeru, da je čredi omogočen izhod iz hleva, se bakterije podvrste MAP s fecesem lahko prenesejo tudi v bližnjo okolico kmetije, kot so skupni izhodi na pašnike, površina pašnikov ali stoječa voda, kot posledica stekanja vode s kmetijskih površin (Raizman in sod., 2004). Kljub temu, da so bakterije podvrste MAP naj ne bi razmnoževale izven gostitelja, jim visoka odpornost na okoljske dejavnike omogoča dolgotrajno perzistenco v okolju. V prsti, kontaminirani s fecesom, v senci, lahko preživijo do 55 tednov, medtem ko na sončnih predelih precej manj (Whittington in sod., 2005). V sedimentu zunanjih vodnih napajalnikov, kontaminiranih s fecesom, lahko preživijo do 48, v vodi napajalnika pa do 36 tednov. Isti viri navajajo pri bakterijah podvrste MAP možnost obstoja dormantne faze, na kar je kazala začasna nekultivabilnost tekom poskusa (Whittington in sod., 2005; Whittington in sod., 2004). Kot bakterije podvrste MAH tudi bakterije podvrste MAP

tvorijo biofilme, kjer so bolj odporna na zunanje dejavnike in bolj obstojne. Primerjave preživetja bakterij podvrste MAP v biofilmih napajalnikov iz betona, plastike, galvaniziranega in nerjavečega jekla so pokazale skoraj nespremenjene količine MAP celo po 1 letu poskusa (Cook in sod., 2010). Zaradi spiranja kontaminiranih površin, zlasti ob močnem deževju, lahko pride tudi do kontaminacije površinskih voda, kjer se bakterije MAP nahajajo na suspendiranih delcih prsti (Pickup in sod., 2005). Zaidejo lahko tudi v pitno vodo preko vodovodnih distribucijskih sistemov, kar predstavlja tveganje za okužbo pri človeku, v primeru, da je podvrsta MAP vpletena v etiologijo Crohnove bolezni (Pickup in sod., 2005; Pickup in sod., 2006; Pierce, 2009a). V eni izmed raziskav v ZDA so bil bakterije podvrste MAP prisotne kar v 80-90% vzorcev hladne vode za domačo uporabo in biofilmov iz mrežic na pipah (Beumer in sod., 2010), vendar so nasplošno poročila o tako visokih deležih pozitivnih vzorcev redka. Perzistenca bakterij podvrst MAP v okolju predstavlja velik problem pri omejevanju paratuberkuloze. Kontaminirane okolice kmetij so lahko vir infekcije za različne vrste divjih živali, ki se gibljejo na tem območju, zaradi česar obstaja možnost prenosa bakterij podvrste MAP med kmetijami (Slika 3) (Corn in sod., 2005; Nugent in sod., 2011). Trenutno ni učinkovitih ukrepov za eliminacijo bakterij podvrste MAP iz okuženih kmetij in okolja. Saniranje močno prekuženih kmetij vključuje odstranitev vse živine (depopulacija) ter kemično ali mehansko dezinfekcijo poslopij in okolja, vendar z omejeno uspešnostjo. Moravkova in sod. so poročali o upadu deleža vzorcev, pozitivnih za prisotnost bakterij podvrste MAP, iz 81% na 43%, 2 leti po depopulaciji kmetije, dezinfekciji poslopij s kloraminom/amonijakom ter okolja z apnom. Povprečne koncentracije bakterij MAP v vzorcih so pred in 2 leti po posegu kljub temu ostale primerljive (Moravkova in sod., 2012).

Bakterije podvrste MAP se izločajo tudi v mleko okuženih krav ali vanj pridejo preko kontaminiranih površin (vime, molzni stroj, itn.), zaradi česar jih najdemo tudi v mlečnih izdelkih, namenjenih za človeško uporabo (Ikonomopoulos in sod., 2005; Stephan in sod., 2007). Po nekaterih študijah naj bi preživele klasične pasterizacijske postopke, spet druge niso potrdile takšnih domnev (Ellingson in sod., 2005; Eltholth in sod., 2009; Gao in sod., 2002). V večini raziskav prisotnosti bakterij MAP v mleku je bil delež pozitivnih vzorcev večji v primeru detekcije s PCR kot pa v primeru detekcije z gojenjem, kar lahko pomeni bodisi prisotnost ostankov DNK neviabilnih bakterij ali pa prisotnost nekultivabilnih bakterij. Podvrste MAP preživijo vsaj 6 tednov tudi v jogurtih in vsaj 120 dni tekom zorenja sirov (Spahr in Schafroth, 2001; Van Brandt in sod., 2011). Kakšen je vpliv kontaminacije prehrambnih izdelkov na človeka zaenkrat še ni raziskano, predvsem na račun nerazjasnjene vloge podvrst MAP pri Crohnovi bolezni.



Slika 3: Shematski prikaz kroženja bakterij podvrst MAH in MAP v okolju
Polne puščice – podvrste MAH; *Prazne puščice* – podvrste MAP; debeline puščic simbolično ponazarjajo relativno količino bakterij podvrst MAH ali MAP na posamezni poti.
Figure 3: Cycling of MAH and MAP in the environment
MAH – full arrows, MAP – transparent arrows; the width of the arrows symbolically represents the relative amounts of MAH or MAP on a specific path.

2.2.6.4 Vloga praživali pri ekologiji mikobakterij in podvrst bakterije *Mycobacterium avium*

Mikobakterije si v okolju delijo življenjski prostor med drugim tudi s praživalmi. Paralele intracelularnega življenja v makrofagih najdemo v interakcijah mikobakterij s praživalmi, predvsem z amebami. Amebe imajo v okolju pomembno vlogo kontrole bakterijskih populacij, nekatere novejše raziskave pa pripisujejo amebam tudi vlogo pri evoluciji intracelularnih bakterij kot posledica simpatričnega načina življenja in horizontalnega prenosa genov (Boyer in sod., 2009; Lamrabet in sod., 2012b).

Za mikobakterije je značilno, da so odporne na fagocitozo in lahko preživijo znotraj vakuol v amebah dalj časa. Kot v makrofagu tudi v amebah predvidoma preprečujejo zorenje fagosoma oz. prebavne vakuole. Interakcije z amebami so zaenkrat opazili pri amebah *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmanella vermiformis*, socialni amebi *Dictyostelium discodium* in bičkarju *Tetrahymena pyriformis* (Thomas in McDonnell, 2007). Kljub odpornosti na fagocitozo pa se mikobakterije med seboj razlikujejo glede na nadaljnjo usodo znotraj ameb, vendar razlogi za to še niso natančno znani. Nekatere hitro rastoče, saprofitske mikobakterije kot so *M. fortuitum*, *M. smegmatis* in *M. phlei* se hitro razmnožujejo znotraj ameb in povzročijo lizo v petih dneh od internalizacije (Krishna Prasad in Gupta, 1978; Lamrabet in sod., 2012a). Spet druge mikobakterije, kot so *M. ulcerans*, *M. leprae* in *M. bovis*, ter nekatere netuberkulozne okoljske mikobakterije, kot sta *M. goodii* in *M. gordonae* preživijo v amebah, tako v trofozoitah kot cistah, vendar se ne razmnožujejo (Preglednica 1) (Adekambi in sod., 2006; Gryseels in sod., 2012; Lahiri in Krahenbuhl, 2008; Taylor in sod., 2003). Atenuiran sev *M. bovis* (BCG) ni sposoben preživetja v *Acanthamoebi castellanii*, kar nakazuje na povezavo intracelularnega preživetja v amebah z virulenco in preživetjem v makrofagih (Taylor in sod., 2003). *M. marinum* in *M. tuberculosis* preživita fagocitozo, se intracelularno razmnožujeta in izstopita iz ameb z amebnimi transportnimi vezikli (t.i. 'ejektosomi'), preden se amebe transformirajo v ciste in brez poškodb amebe. Sposobnost izstopa iz amebe naj bi bila povezana s prisotnostjo RD1 lokusa, ki vsebuje gene za ESX-1 sekrecijski sistem. Odsotnost tega sistema pri bakteriji *M. avium* vpliva na okrnjeno izstopanje iz amebe vrste *D. discodium* (Hagedorn in sod., 2009; Mba Medie in sod., 2011). Nekatere oportunistično patogene mikobakterije kot sta *M. xenopi* in *M. kansassii* ter *M. avium* podvrste naj bi bile sposobne tako preživetja v trofozoitah in cistah ameb, kot tudi intracelularnega razmnoževanja (Preglednica 1) (Cirillo in sod., 1997; Drancourt in sod., 2007; Mura in sod., 2006; Skriwan in sod., 2002; Whan in sod., 2006). Rezultati različnih raziskav odnosov med mikobakterijami in amebami so pogosto kontradiktorni in pomanjkljivi, saj se eksperimentalni pogoji zelo razlikujejo, predvsem glede na temperaturo inkubacije mikobakterij z amebami, čas inkubacije, prehranski status ameb in mikobakterij, multipliciteto infekcije, itn. Potrebne so dodatne raziskave za razjasnitev vpliva različnih dejavnikov na razplet infekcije ameb z mikobakterijami.

Odpornost na fagocitozo in intracelularni način življenja v amebah omogoča mikobakterijam zaščito pred zunanjimi dejavniki in perzistenco v okolju. To je še zlasti pomembno za obligatne patogene, ki niso sposobni samostojne rasti v okolju (npr. bakterije podvrste MAP). Mikobakterije znotraj ameb so bolj odporne na antibiotike in dezinfekcijska sredstva, preživetje v cistah pa jim nudi tudi zaščito pred izsušitvijo in ostalimi neugodnimi okoljskimi pogoji (Adekambi in sod., 2006; Miltner in Bermudez, 2000; Whan in sod., 2006). Poleg tega so amebe neke vrste poligon za potenciacijo virulentnega fenotipa. Pokazali so, da se je *M. avium*, ki je predhodno rasla v amebah,

bolje razmnoževala v človeških makrofagih in kazala bolj invaziven fenotip v mišjem modelu infekcije, v primerjavi z istim sevom *M. avium*, ki je rasel v gojišču (Cirillo in sod., 1997). Sposobnost razmnoževanja v amebah variira med različnimi sevi *M. avium* in sevi, ki bolje rastejo v amebi, so bolj uspešni pri razmnoževanju v makrofagih, kar kaže tudi na genetsko predispozicijo interakcije z amebami/makrofagi (Cirillo in sod., 1997).

Tudi za bakterije podvrste MAP je znano, da lahko vstopajo in preživijo v amebah. Po 3-urni inkubaciji bakterije podvrste MAP z amebami vrste *A. castellanii* in *A. polyphaga* na 25 °C se je približno 13 % in 6,6 % mikobakterij nahajalo znotraj ameb (multipliciteta infekcije 10 bakterij/amebo). Število intracelularnih bakterij MAP je v prvih 7 dneh upadlo za 0,5 $\log_{10}$, nato pa je do 24. dneva naraslo za nekoliko več kot 1 $\log_{10}$ (Whan in sod., 2006). Podobne rezultate so dobili Mura in sod., dodatno pa so opazili, da upad števila intracelularnih mikobakterij sovpada s tvorbo amebnih cist, vendar pa so se številke bakterij podvrste MAP obnovile po vrnitvi ameb v aktivno trofozoitno fazo. Viabilne bakterije podvrste MAP iz ameb so lahko izolirali tudi po 4 letih inkubacije, kar kaže na ključno vlogo intracelularnega življenja v amebah na perzistenco te bakterije v okolju (Mura in sod., 2006). Zanimivo je tudi opažanje, da je intracelularno okolje ameb omogočalo razmnoževanje MAP brez eksogeno dodanega mikobaktina, ki je sicer nepogrešljiv za razmnoževanje MAP v laboratorijskih pogojih (Mura in sod., 2006). Mehanizem privzema železa pri bakterijah podvrste MAP, tako v amebah, kot v makrofagih, je do sedaj še neraziskan.

Preglednica 1: Interakcije mikobakterij z amebami
Table 1: Interactions between amoeba and mycobacteria

Klas.[a]	*Mikobakterija*	*Ameba*	*Preživetje v amebi*		*Razmnož. v trofozoiti*	*Liza amebe*	*Vir*
			Trofozoite	*Ciste*			
S/OB	*M. bovis*	*A. castellanii*	+	+	-	-	(Mba Medie in sod. 2011, Taylor in sod. 2003)
S/AV	*M. bovis BCG*	*A. castellanii*	-	-	-	-	(Taylor in sod. 2003)
S/OB	*M. leprae*	*A. castellanii*	+	?	?	-	(Lahiri in Krahenbuhl 2008)
S/OB	*M. tuberculosis*	*D. discodium*	+	+	+	-	(Hagedorn in sod. 2009, Mba Medie in sod. 2011)
S/OP	*M. marinum*	*D. discodium*	+	-	+	-	(Hagedorn in sod. 2009)
F/OP	*M. fortuitum*	*A. castellanii*	+	-	+	+	(Krishna Prasad in Gupta 1978)
F/OP	*M. abscessus*	*A. polyphaga*	+	+	?	+	(Adekambi in sod. 2006, Pagnier in sod. 2008)
F/OP	*M. ulcerans*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Gryseels in sod. 2012)
F/E	*M. smegmatis*	*A. polyphaga*	+	-	+	+	(Lamrabet in sod. 2012a)
F/E	*M. phlei*	*A. castellanii*	+	-	+	+	(Krishna Prasad in Gupta 1978)
F/OP	*M. intracellulare*	*A. polyphaga*	+	+	+	-	(Ben Salah in Drancourt 2010, Strahl in sod. 2001)
S/OP	*M. avium ssp. hominissuis*	*D. discodium*	+	+	+	-	(Ben Salah in Drancourt 2010, Cirillo in sod. 1997,
S/OB	*M. avium ssp. paratuberculosis*	*A. castellanii*	+	+	+	-	(Mura in sod. 2006, Whan in sod. 2006)
S/OB	*M. avium ssp. avium*	*D. discodium*	+	+	+	-	(Skriwan in sod. 2002)
S/OP	*M. kansasii*	*A. castellanii*	+	+	+	-	(Goy in sod. 2007)
S/OP	*M. xenopi*	*A. polyphaga*	+	+	+	-	(Drancourt in sod. 2007)
S/OP	*M. chimerae*	*A. polyphaga*	+	+	+	-	(Ben Salah in Drancourt 2010)
S/OP	*M. colombiense*	*A. polyphaga*	+	+	+	-	(Ben Salah in Drancourt 2010)
S/OP	*M. marseillense*	*A. polyphaga*	+	+	+	-	(Ben Salah in Drancourt 2010)
F/OP	*M. chelonae*	*A. polyphaga*	+	+	?	+	(Adekambi in sod. 2006, Pagnier in sod. 2008)
F/OP	*M. goodii*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)
F/E	*M. aurum*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)
S/OP	*M. terrae*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)
S/OP	*M. gordonae*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)
S/OB	*M. canettii*	*A. polyphaga*	+	-	?	-	(Mba Medie in sod. 2011)
S/OP	*M. scrofulaceum*	*T. pyriformis*	+	+	+	-	(Strahl in sod. 2001)
S/OP	*M. bohemicum*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)
S/OP	*M. gastri*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 1: Interakcije mikobakterij z amebami

Klas.[a]	*Mikobakterija*	*Ameba*	*Preživetje v amebi*		*Razmnož. v trofozoiti*	*Liza amebe*	*Reference*
			Trofozoite	*Ciste*			
F/OP	*M. immunogenum*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)
F/OP	*M. mucogenicum*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)
F/OP	*M. peregrinum*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)
F/OP	*M. mageritense*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)
S/OP	*M. szulgai*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)
S/OP	*M. malmoense*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)
S/OP	*M. tusciae*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)
S/OP	*M. simiae*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)
S/OP	*M. lentiflavum*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)
F/OP	*M. septicum*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)
F/OP	*M. porcinum*	*A. polyphaga*	+	+	?	-	(Adekambi in sod. 2006)
S/OP	*M. timonense*	*A. polyphaga*	+	+	+	-	(Ben Salah in Drancourt 2010)
S/OP	*M. bouchedurhonense*	*A. polyphaga*	+	+	+	-	(Ben Salah in Drancourt 2010)
S/OP	*M. arosiense*	*A. polyphaga*	+	+	+	-	(Ben Salah in Drancourt 2010)
F/OP	*M. monacense*	*A. polyphaga*	+	?	+	+	(Pagnier in sod. 2008)
F/E	*M. neoaurum*	*A. polyphaga*	+	?	+	+	(Pagnier in sod. 2008)

[a] Klasifikacija glede na patogenost in hitrost rasti (Kazda in sod. 2009, Mignard in Flandrois 2008): S – počasna rast; F – Hitra rast; OB – obligatni patogen; OP – oportunistični patogen; E – saprofit (oz. brez podatkov o infekciji pri ljudeh); AV-avirulenten sev

2.3 HOMEOSTAZA ŽELEZA

2.3.1 Pomen in dostopnost železa

Železo je četrti najpogostejši element v zemeljski skorji in je zaradi svojih fizikalno-kemijskih lastnosti idealen kot biokatalizator/kofaktor v številnih encimskih reakcijah in prenašalec elektronov v živih sistemih. Zaradi tega je nepogrešljiv za večino živih bitij, z redkimi izjemami. Kljub njegovem izobilju v okolju pa je dostop do prostega železa omejen, saj v aerobnih in pH nevtralnih pogojih železo obstaja večinoma v oksidirani obliki Fe^{3+}, ki tvori slabo topne okside in hidrokside (topnost ~ 10^{-9} M) (Andrews in sod., 2003; Chipperfield in Ratledge, 2000). Za rast večine bakterij je potrebna koncentracija železa med 10^{-7} in 10^{-5} M, zato so bakterije razvile različne mehanizme, ki jim omogoča pridobivanje zadostnih količin železa iz okolja. Ti mehanizmi vključujejo i) znižanje ekstracelularnega pH, kar poveča topnost železa (10^{-8} M pri pH 3); ii) redukcija Fe^{3+} v bolj topno obliko Fe^{2+} in iii) uporaba visoko afinitetnih kelacijskih molekul - sideroforov, ki vežejo železo iz kompleksov ali precipitatov (Guerinot, 1994).
Po drugi strani so lahko viški železa toksični za celice. Fe^{3+} lahko v celicah reagira s superoksidnimi anioni, ki nastanejo kot stranski produkt aerobne respiracije, pri čemer se sprošča reducirano železo Fe^{2+} (1). Slednje sodeluje v Fentonovi reakciji z vodikovim peroksidom, pri čemer nastajajo hidroksilni radikali, ki lahko porušijo redoks ravnovesje v celici in povzročajo oksidativne poškodbe DNK, proteinov in lipidov (2) (Harrington in Crumbliss, 2009; Keyer in Imlay, 1996).

$$Fe^{3+} + O_2^{-\bullet} \leftrightarrow Fe^{2+} + O_2 \quad ...(1)$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \leftrightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^{-} \quad ...(2)$$

Intracelularne koncentracije prostega železa so zato natančno kontrolirane z vezavo na različne ligande, ki v primeru viškov shranjujejo železo za kasnejšo uporabo in hkrati ščitijo celico pred oksidativnim stresom. Takšno vlogo imajo feritini pri evkariontih in bakteroferitini pri bakterijah (Smith, 2004).

Za uspešno vzdrževanje homeostaze železa je zato potrebno natančno in pravočasno zaznavanje ravni železa v celici ter usklajen metabolni odziv med sistemi za pridobivanje železa na eni strani in sistemi za shranjevanje oziroma odstranjevanje na drugi strani.

Podobno kot v okolju je tudi v gostitelju dostopnost železa nizka. Zaradi toksičnosti in ker je železo omejujoči dejavnik za rast večine patogenih bakterij, so ravni prostega železa v gostitelju strogo regulirane. Večina železa (~75%) v človeku je vezanega v proteinih, ki vsebujejo hem, preostanek je vezan na plazemski protein transferin in pa laktoferin, ki se nahaja v izločkih sluznice. Intracelularne zaloge železa so vezane v feritinu, ki lahko shrani vsaj 4000 atomov železa (Carrondo, 2003). Vezava v komplekse je razlog za izredno nizke koncentracije prostega železa v gostitelju, ki se gibljejo okoli 10^{-24} M (Miethke in Marahiel, 2007).

Ob infekciji makrofagov z intracelularnimi patogeni, kot so mikobakterije, se aktivira obrambni mehanizem, ki med drugim vključuje dodatno restrikcijo železa. Labilne zaloge železa v citoplazmi se mobilizirajo v feritin, poviša se efluks železa iz makrofaga preko feroportinov (Paradkar in sod., 2008). Zmanjša se tudi število površinskih receptorjev za transferin na zunanji membrani makrofaga in transport holo-transferina z endocitozo do endosomskih veziklov, ki vsebujejo bakterije. (Nairz in sod., 2010). Restrikcija železa je

eden izmed ključnih dejavnikov, ki omejuje rast mikobakterij v makrofagih in omogoča uspešno kontrolo infekcije. Povečane količine železa zaužitega s hrano ali prehranskimi dodatki so povezane s hitrejšim napredovanjem infekcije z *M. tuberculosis* (Gangaidzo in sod., 2001). Prav tako so za okužbo z mikobakterijami bolj dovzetni bolniki z AIDS, za katere so znane povišane intracelularne koncentracije železa v makrofagih (McDermid in sod., 2007). Nasprotno se *M. tuberculosis* slabše razmnožuje v makrofagih bolnikov z dedno hemokromatozo, za katere so, kljub splošni preobremenitvi z železom, značilne znižane intracelularne koncentracije železa v makrofagih (Olakanmi in sod., 2007).

2.3.2 Odziv mikobakterij na pomanjkanje železa

Odziv mikobakterij na pomanjkanje železa je odvisen od kompleksne mreže od železa odvisnih regulatorjev, ki narekujejo metabolni odziv celice na različnih nivojih. Najbolj pomembna in znana regulatorja sta IdeR (*ang.* iron dependent repressor), ki spada v DxtR družino represorjev, in FurA represor (*ang.* ferric uptake regulator), ki povezuje regulacijo homeostaze železa z odzivom na oksidativni stres. Ob pomanjkanju železa IdeR sprosti transkripcijo iz različnih operonov (Rodriguez in sod., 2002). Med najbolj pomembnimi za homeostazo železa so vsekakor operoni, ki kodirajo encime/proteine za sintezo in transport sideroforov ter shranjevanje železa. Hkrati se v pogojih pomanjkanja železa zmanjša sinteza neesencialnih proteinov, ki potrebujejo železo kot kofaktor, in inducira sinteza le tistih, od železa odvisnih proteinov, ki sodelujejo v pomembnih procesih za preživetje bakterije, kot so prenos elektronov, pridobivanje energije in sinteza DNK. Dodatni operoni s spremenjeno ekspresijo v pogojih pomanjkanja železa vključujejo gene za metabolizem aminokislin in maščobnih kislin, sintezo celične stene, transmembranski transport, sintezo z virulenco povezanih membranskih proteinov iz družine PE in PPE, različnih transkripcijskih regulatorjev, ter številne proteine, katerih funkcija še ni znana (Rodriguez in sod., 2002). Poviša se tudi izražanje gena *icl* (*aceA*), ki kodira za izocitrat liazo, pomemben encim pri preusmerjanju ogljikovega metabolizma v produkcijo triacilgliceridov, značilno za dormantni fenotip *M. tuberculosis* (Baek in sod., 2011; Rodriguez in sod., 2002). Zanimiv pojav skupen vsem mikobakterijam je intra- in ekstracelularna akumulacija salicilata v pogojih pomanjkanja železa, ki se glede na količine razlikuje med vrstami (Ratledge in Winder, 1962). Salicilat je sicer prekurzor za mikobakterijske siderofore, vendar razlog za akumulacijo zaenkrat še ni znan. Domneve, da salicilat lahko sodeluje pri privzemu železa, so bile ovržene zaradi nizke afinitete in stabilnosti salicilata v kompleksu z železom (Chipperfield in Ratledge, 2000).

Obseg metabolnih prilagoditev mikobakterij na pomanjkanje železa povzroči pri *M. tuberculosis* nastanek distinktivnega fenotipa, za katerega je značilna z lipidi in voski obogatena celična stena (Bacon in sod., 2007). Mikobakterije so ob infekciji makrofagov, poleg drugim stresorjem (nizek pH, oksidativni stres, pomanjkanje nutrientov), izpostavljene tudi pomanjkanju železa, kar lahko prispeva k fenotipsko pogojenim spremembam v profilu odpornosti na antibiotike, glede ne profil v optimalnih *in vitro* pogojih. *M. tuberculosis* npr. je v dormantni fazi odporna na večino antibiotikov, ki sicer kažejo aktivnost v običajnih *in vitro* pogojih (Baek in sod., 2011).

2.3.3 Homeostaza železa in občutljivost na antibiotike

Soodvisnost homeostaze železa in odpornosti na antibiotike lahko obstaja na več ravneh. Prvič, geni za proteine, ki so vpleteni v mehanizme antibiotskega delovanja, so lahko pod kontrolo od železa odvisnih regulatorjev. Tak primer je beta-laktamazni transkripcijski faktor BlaI pri *M. tuberculosis*, ki je pod regulacijo IdeR in regulira transkripcijo z operonov, vpletenih v funkcijo celične stene, transport antibiotikov in detoksifikacijo beta-laktamskih antibiotikov (Sala in sod., 2009). Še en primer je mikobakterijska katalazna peroksidaza KatG, katere gen je pod regulacijo od železa odvisnega regulatorja FurA. KatG je potrebna za zaščito celice pred oksidativnim stresom in hkrati za pretvorbo mikobakterijskega antibiotika isoniazid (INH) v aktivno, baktericidno obliko (Zhang in sod., 1992). Povišana aktivnost KatG je povezana z večjo občutljivostjo *M. tuberculosis* na INH (Pym in sod., 2001), medtem ko je občutljivost manjša v pogojih pomanjkanja železa, predvsem na račun zmanjšane, od železa odvisne, peroksidazne aktivnosti KatG, ki je potrebna za konverzijo INH v aktivno obliko (Sritharan in sod., 2006).

Drugič, nekateri antibiotiki neposredno interferirajo z mehanizmi privzema železa. Primer je zelo učinkovit antibiotik proti *M. tuberculosis* *4*-aminosalicilat (PAS), ki je sprva veljal za inhibitorja sinteze folata (Rengarajan in sod., 2004), zadnje raziskave pa kažejo, da inhibira tudi sintezo mikobakterijskih sideroforov in je znatno bolj učinkovit v pogojih pomanjkanja železa (Brown in Ratledge, 1975; Nagachar in Ratledge, 2010a).

Tretjič, toksičnost baktericidnih antibiotikov je delno posledica porušene homeostaze železa. Ob izpostavljenosti baktericidnim antibiotikom pride v celici, neodvisno od tarče delovanja, do kopičenja superoksidnih ionov, ki povzročajo oksidacijo in luženje železa iz Fe-S katalitskih centrov različnih proteinov. Posledično se poveča citoplazemska raven prostega železa (Fe^{2+}), ki preko Fentonovih reakcij katalizira nastanek reaktivnih hidroksilnih radikalov (Dwyer in sod., 2007). Citotoksični učinki antibiotikov se močno znižajo v primeru znižanih intracelularnih zalog železa, kar posledično povzroči nižjo občutljivost na antibiotike (Kohanski in sod., 2007).

Četrtič, salicilat, ki se v mikobakterijah kopiči ob pomanjkanju železa, lahko vpliva na odpornost na antibiotike. Pri *E. coli* salicilat inducira razvoj multirezistentnega Mar fenotipa, ki je zaznamovan z znižanim izražanjem influksnih porinov in povečanim delovanjem efluksnih črpalk (Cohen in sod., 1993). Čeprav pri mikobakterijah homolog *mar* operona ni bil identificiran, eksogeni salicilat inducira povečano odpornost *M. tuberculosis* na številne antibiotike, najbolj izrazito na *4*-aminosalicilat, streptomicin in etambutol (Nagachar in Ratledge, 2010a; Schaller in sod., 2002).

Nazadnje lahko na odpornost vplivajo same fiziološke spremembe, ki se inducirajo ob pomanjkanju železa. Preurejanje celične stene in povečana hidrofobnost lahko vplivata na penetracijo antibiotikov v celico (Nguyen in Thompson, 2006). Tarčni procesi so zaradi fiziološkega stanja ob pomanjkanju železa lahko bolj ali manj odporni na delovanje antibiotikov. Tako so npr. počasi deleče se celice v dormantni fazi rasti bolj odporne na antibiotike, ki delujejo na procese hitro rastočih celic (Baek in sod., 2011).

Spremenjena odpornost na antibiotike v pogojih pomanjkanja železa bi lahko kritično vplivala na učinkovitost zdravljenja mikobakterijskih infekcij. Manjša občutljivost lahko prispeva k nižji učinkovitosti antibiotikov in hkrati razvoju odpornosti zaradi izpostavljenosti subinhibitornim koncentracijam antibiotikov (Kohanski in sod., 2010). Večja občutljivost bi po drugi strani omogočala uporabo nižjih terapevtskih koncentracij antibiotikov in s tem zmanjšanjem toksičnih učinkov na pacienta. Za mikobakterijske

infekcije so znane dolge terapevtske dobe (vsaj 6 mesecev), poleg tega pa *in vitro* učinkovitosti antibiotikov ne korelirajo z *in vivo* odzivi, kar je še zlasti značilno za bakterije podvrste MAH in MAP (Inderlied, 1997; St-Jean in Jernigan, 1991). To bi lahko bila posledica razlik v dostopnosti železa med *in vitro* testi odpornosti in *in vivo* pogoji, saj so testna gojišča za mikobakterije večinoma bogata z železom (7H-serija, Loewenstein-Jensen: [Fe] > 100 μM), medtem ko je v makrofagih dostopnost železa močno omejena (Schnappinger in sod., 2003).

2.3.4 Mehanizmi privzema železa pri mikobakterijah

Privzem železa pri po Gramu pozitivnih bakterijah poteka v štirih fazah, i) vezava železa v ekstracelularnem prostoru, ii) transport železa preko celične stene, iii) transport železa preko celične membrane in iv) redukcija in vezava železa v bakterioferitin in druge intracelularne komplekse. Privzem lahko poteka preko visoko afinitetnih sideroforov, nizko afinitetnih kompleksov ali neposredno, s privzemom prostih kationov preko porinov/permeaz (Andrews in sod., 2003).

Mikobakterije proizvajajo dve vrsti sideroforov, eksoheline in mikobaktine. Saprofitske mikobakterije, kot je *M. smegmatis* proizvajajo obe vrsti sideroforov, medtem ko obligatno patogene, kot *M. tuberculosis* in *M. bovis*, ter nekatere oportunistično patogene mikobakterije, kot so podvrste bakterije *M. avium*, proizvajajo le mikobaktine (De Voss in sod., 1999). Mikobaktini se po strukturi delijo na polarne karboksimikobaktine (cMB), ki se izločajo v ekstracelularni prostor, in bolj lipofilne mikobaktine (MB), ki so zasidrani v celični steni ali membrani in sodelujejo pri transportu železa iz karboksimikobaktinov v intracelularni prostor (Macham in sod., 1975).

Status nizkoafinitetne siderofore pri mikobakterijah je sprva imel tudi salicilat, vendar slaba stabilnost feri-salicilata v fizioloških pogojih gostitelja takšne klasifikacije ne podpira (Ratledge in sod., 1974). Feri-salicilati so stabilni le v okolju z nizkimi koncentracijami fosfatov, ki sicer povzročijo precipitacijo železa iz feri-salicilatnega kompleksa. Možno je, da ima salicilat bolj pomembno vlogo pri privzemu železa izven gostitelja, v okoljih z nizkimi koncentracijami fosfatov, kot so npr. čista vodna okolja (Ratledge in sod., 1974). Med nizkoafinitetnimi ligandi za železo pri mikobakterijah se omenja tudi citrat (Messenger in sod., 1986; Messenger in Ratledge, 1982). *E. coli* privzema feri-dicitrat s periplazemskim transportnim proteinom, kodiranim s *fecB*, katerega homolog je prisoten tudi v večini mikobakterij in je pod regulacijo IdeR, celo pri *M. leprae*, ki ne proizvaja mikobaktinov (Yellaboina in sod., 2006).

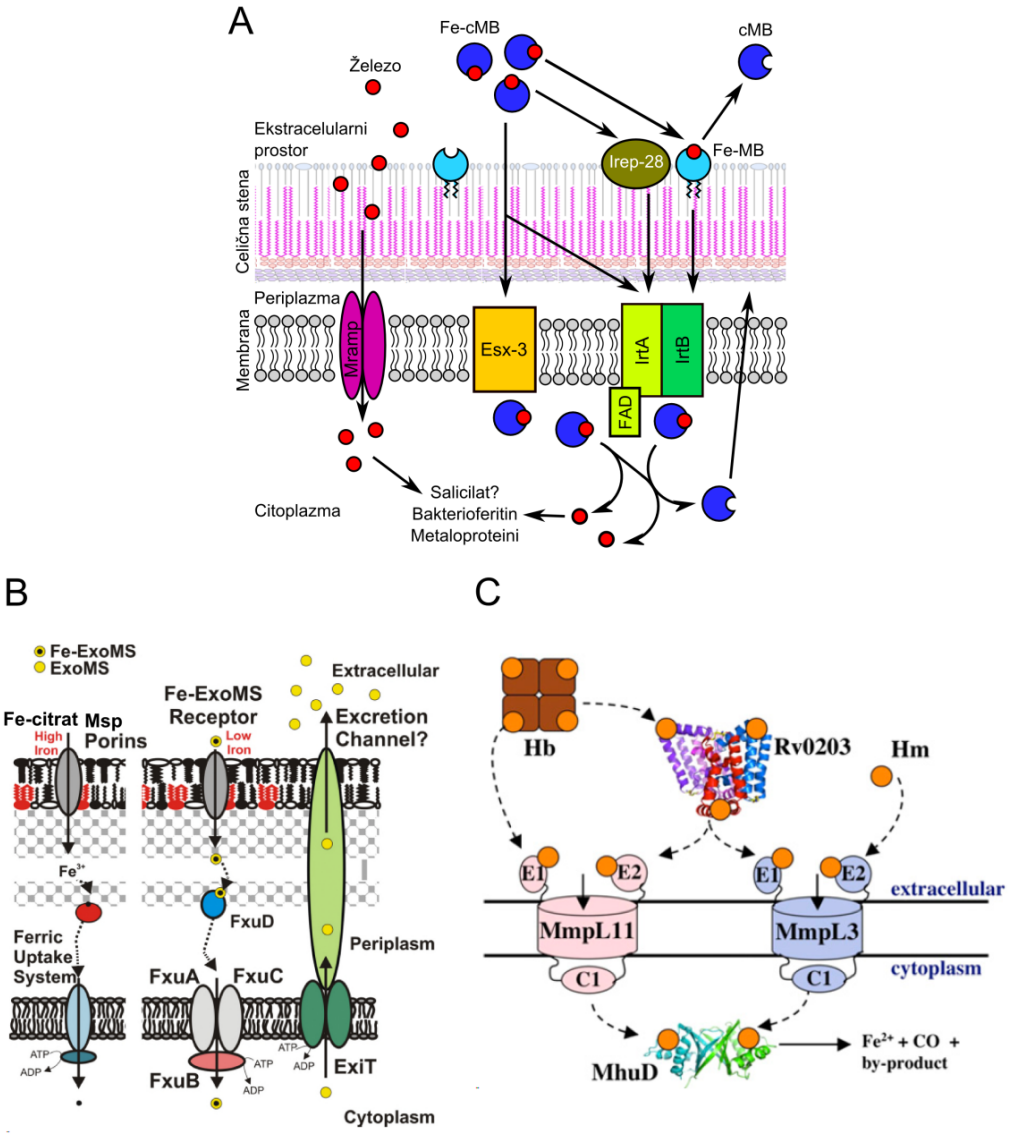
Transport železa preko celične stene in membrane mikobakterij je slabo raziskan. Feri-eksohelini *M. smegmatis* se v prvem koraku vežejo na receptorje v celični steni. Takšno funkcijo naj bi imeli različni proteini iz skupine Irep (*ang.* iron regulated envelope protein), še zlasti Irep-29, katerega blokada s protitelesi prepreči privzem feri-eksohelinov (Dover in Ratledge, 1996; Hall in sod., 1987). Sledi prenos kompleksa železo-eksohelin na periplazemski protein FxuD in internalizacija preko membransko zasidranega kompleksa FxuABC, ki spada v družino ABC transporterjev. Znotraj celice se železo sprosti iz siderofore preko redukcije z reduktazami, apo-eksohelin pa se reciklira in izloči preko ExiT ABC transporterja nazaj v ekstracelularni prostor (Slika 4B) (Zhu in sod., 1998).

Glavni receptor za karboksimikobaktine pri patogenih mikobakterijah naj bi bil membransko vezan MB (Gobin in Horwitz, 1996), vendar pa mutacija v operonu za sintezo obeh vrst mikobaktinov ne preprečuje pridobivanje železa s pomočjo eksogeno

dodanega feri-cMB (Fe-cMB) (Rodriguez in Smith, 2006). To pomeni, da morajo obstajati dodatni receptorji/transporterji za Fe-cMB, ki so neodvisni od MB. Rodriguez in sodelavci so pokazali, da je ABC transportni sistem iz transmembranskih proteinov IrtA in IrtB nujen za privzem Fe-cMB pri *M. tuberculosis* in da delecija genov za oba proteina zmanjša sposobnost rasti v mediju brez železa in v makrofagih (Rodriguez in Smith, 2006; Ryndak in sod., 2010). Možno je, da MB deluje le kot ionofor, ki poveča učinkovitost prehajanja železa preko celične stene, do membranskih transporterjev, kot je IrtAB (Rodriguez, 2006) (Slika 4A). IrtA vsebuje na citoplazemskem N-terminalnem delu domeno za vezavo FAD (flavin adenin dinukleotid), ki sodeluje pri redukciji in sproščanju železa iz siderofore (Ryndak in sod., 2010). Poleg IrtAB so različne raziskave identificirale dodatne proteine vpletene v transport železa s Fe-cMB pri mikobakterijah. Delecija Esx-3 lokusa (*esxG* in *esxH*), ki je del mikobakterijskega sekrecijskega sistema tipa 7 (T7SS) in je pod IdeR regulacijo, onemogoči privzem železa iz Fe-cMB pri *M. bovis* in *M. smegmatis,* medtem ko produkcija sideroforov v pogojih pomanjkanja železa ni motena (Siegrist in sod., 2009). Yeruva in sod., 2004, so pokazali na možno vpletenost Irep-28 v transport železa z mikobaktini pri *M. tuberculosis*. Izražanje Irep-28 pozitivno korelira s produkcijo mikobaktinov, lokaliziran je v celični steni in je imunoreaktiven v kombinaciji s serumom iz tuberkuloznih bolnikov ter je ohranjen pri večini mikobakterij, tudi pri bakterijah podvrste MAP (Yeruva in sod., 2006) (Slika 4A).

Privzem železa preko sideroforov je omejen na pogoje pomanjkanja železa, medtem ko so za privzem železa v pogojih normalne ali povišane dostopnosti železa potrebne druge transportne poti. Takšno vlogo prevzamejo različne permeaze/porini, ki bolj ali manj specifično prepuščajo topno železo. Pri *M. smegmatis* so to Msp porini (MspABCD), ki sodelujejo pri privzemu železovega citrata. Njihova inaktivacija povzroči intracelularno pomanjkanje železa povišano produkcijo siderofor, navkljub visokim ekstracelularnim koncentracijam železa (Jones in Niederweis, 2010) (Slika 4B). Zaenkrat ni poročil o homologih Msp porinov pri patogenih mikobakterijah. Pri *M. tuberculosis* je za nespecifični transport železa odgovoren Mramp transporter divalentnih kationov (Slika 4A). Ohranjen je tudi pri MAP in MAH, kjer je pod IdeR kontrolo, ter *M. rhodesiae* in *M. ulcerans* (www.uniprot.org). Mramp lahko prenaša Fe^{2+} kot tudi Zn^{2+}, Cu^{2+} in Mn^{2+}, je odvisen od pH (optimum pH 5.5-6.5) in ni potreben za preživetje v pogojih pomanjkanja železa in v mišjih makrofagih (Agranoff in sod., 1999; Boechat in sod., 2002). Regulacija količin Mramp v membrani omogoča tudi omejevanje privzema železa, kadar so v okolju povišane koncentracije železa (Agranoff in sod., 1999). Mramp je homolog evkariontskega proteina Nramp1 (*ang.* natural resistance-associated macrophage protein, uradni simbol SLC11A1), ki ima zaenkrat še nerazjasnjeno vlogo pri regulaciji železa v makrofagih ob infekciji z mikobakterijami. Rezultati raziskav si namreč nasprotujejo glede vprašanja, ali Nramp1 sodeluje pri povečanem črpanju železa v (oksidativni stres) ali iz (restrikcija železa) fagosomov, kjer se nahajajo mikobakterije (Wyllie in sod., 2002). Nekateri polimorfizmi v genu za Nramp1 naj bi bili povezani s tveganjem za okužbo z različnimi mikobakterijami, tako z *M. tuberculosis* kot tudi z MAH in MAP (Bellamy, 2003).

Pred kratkim je bil v *M. tuberculosis* identificiran tudi operon, ki kodira gene za neposredni privzem železa, vezanega v hemu. Operon kodira 6 genov (*Rv0202c-Rv0207c*) in vključuje gene za hemofor, membranske transportne proteine in citoplazemski protein za razgradnjo hema (Tullius in sod., 2011) (Slika 4C).



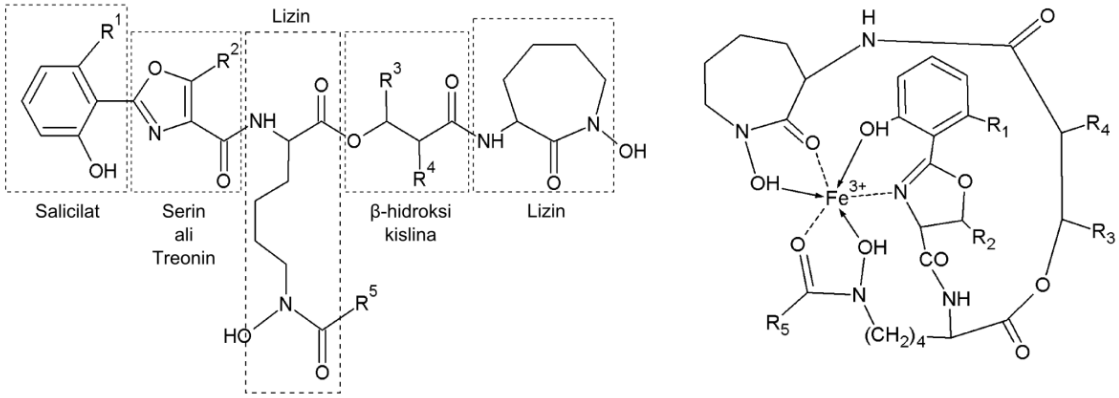
Slika 4: Transport železa pri mikobakterijah (Jones in Niederweis, 2010; Tullius in sod., 2011)
A – predlagani transport železa pri *M. tuberculosis* (povzeto po različnih virih → glej besedilo; razlaga kratic v besedilu); B – predlagani transport železa pri *M. smegmatis* (brez mikobaktinskega transporta) (Jones in Niederweis, 2010: 6416): ExoMS – eksohelin bakterije *M. smegmatis*; Fe-ExoMS – kompleks ExoMS z železom; C – predlagani transport železa s hemom pri *M. tuberculosis* (Tullius in sod., 2011: 5055); Hb – hemoglobin; Hm – hem; Rv0203 – hemofor; MhuD – citoplazemski protein za razgradnjo hema; MmpL11 in MmpL3 – membranski transporterji.

Figure 4: Iron transport in mycobacteria (Jones in Niederweis, 2010; Tullius in sod.; 2011)
A – proposed iron transport in *M. tuberculosis* (compiled according to various references → see main text; abbreviations in the main text): B – proposed iron transport in *M. smegmatis* (without mycobactin mediated iron transport): ExoMS – exochelin of *M. smegmatis*; Fe-ExoMS – ExoMS in complex with iron; C – proposed iron transport through haem in *M. tuberculosis*: Hb – haemoglobin; Hm – haem; Rv0203 – haemophore; MhuD – cytoplasmic haem degradation protein; MmpL11 and MmpL3 – membrane transport proteins.

2.3.5 Mikobaktini

2.3.5.1 Struktura mikobaktinov

Mikobaktine (MB) in karboksimikobaktine (cMB) proizvaja večina mikobakterij, z izjemo mikobakterij podvrste MAP in *M. leprae*. Pri patogenih mikobakterijah so edina vrsta sideroforov, medtem ko saprofitske mikobakterije proizvajajo še eksoheline. Jedro strukture MB in cMB tvori 2-hidroksifeniloksazolin, kondenziran iz salicilata in serina (ali treonina), ki je z amidno vezjo povezan z aciliranim ε-*N*-hidroksilizinom. Lizin je zaestren z β-hidroksi kislino, ki je z amidno vezjo povezana z drugim ε-*N*-hidroksilizinom, ciklizirnim v 7-členski laktam (Slika 5). MB in cMB se med seboj razlikujejo po stranski skupini na R_5 mestu (Slika 5). MB ima na tem mestu dolgo alifatsko verigo, zaradi česar je bolj hidrofoben in zelo slabo topen v vodi. Po drugi strani ima cMB na R_5 krajšo alifatsko verigo, ki se konča s karboksi ali metoksi skupino, zaradi česar je bolj polaren in topen v vodi ter služi kot ekstracelularni siderofor (De Voss in sod., 1999; Gobin in sod., 1995). Afiniteta MB (iz *M. smegmatis*) za železo pri pH 7, podana s K_a, se giblje okoli 10^{26} M^{-1} (MacCordick in sod., 1985).



Slika 5: Struktura mikobaktinov (De Voss in sod., 1999: 4445)
Levo – deferimikobaktin; *Desno* – ferimikobaktin

Mikobaktini se glede na stranske verige razlikujejo med posameznimi vrstami mikobakterij, vendar po strukturi niso specifični za posamezno vrsto, saj se različno substituirani siderofori lahko pojavljajo tudi znotraj vrste ali celo seva. Razlike so predvsem v dolžini in nasičenosti alifatske verige na R_3 in R_5 mestih (Preglednica 2). Pri *M. smegmatis* so zaznali 17 in pri *M. avium* podvrste *avium* kar 20 različnih variant MB in cMB pri enem sevu (Ratledge in Ewing, 1978; Wong in sod., 1996).

Preglednica 2: Strukturna raznolikost mikobaktinov in karboksimikobaktinov
Table 2: Structural diversity of mycobactins and carboxymycobactins

		R_5[b]		
Mikobaktin[a]	***R_3***[b]	***Terminalna skupina***	***n(C)***[c]	***Vrsta/sev***
Av (cMB)[d]	CH_3	$(CH_2)_nCOOCH_3$	2-5	*M. avium ssp. avium 25291*
Av (cMB)[d]	CH_3	$(CH_2)_nCOOH$	1-9	*M. avium ssp. avium 25291*
Av (cMB)[d]	CH_3	$CH=CH(CH_2)_nCOOCH_3$	2-4	*M. avium ssp. avium 25291*
Av (cMB)[d]	CH_3	$CH=CH(CH_2)_nCOOH$	2-7	*M. avium ssp. avium 25291*
Av (MB)[d]	CH_3	$(CH_2)_nCH_3$	14,18	*M. avium ssp. avium 25291*
Av (MB)[d]	CH_3	$CH=CH(CH_2)_nCH_3$	11-14	*M. avium ssp. avium 25291*
T (cMB)[e]	CH_3	$(CH_2)_nCOOCH_3$	1-7	*M. tuberculosis ATCC 35801*
T (cMB)[e]	CH_3	$(CH_2)_xCH=CH(CH_2)_yCOOCH_3$	x+y=1-5	*M. tuberculosis ATCC 35801*
T (MB)[e]	H	$(CH_2)_nCH_3$	16-19	*M. tuberculosis ATCC 35801*
T (MB)[e]	H	$(CH_2)_xCH=CH(CH_2)_yCH_3$	x+y=14-17	*M. tuberculosis ATCC 35801*
J (MB)[f]	$(CH_3)_2CH$	ns[g]	15	*M. a. ssp. paratub. NADC 18*
P (MB)[h]	CH_3CH_2	ns	15-19	*M. phlei*
S (MB)[h]	CH_3	ns	9-19	*M. smegmatis*
F (MB)[h]	CH_3	ns	7-19	*M. fortuitum*
M (MB)[h]	C_{15}-C_{18}	ns	1	*M. marinum*

[a] Imena mikobaktinov običajno izvirajo iz začetnic mikobakterijska vrste; MB – hidrofobni mikobaktin; cMB – karboksimikobaktin; [b] indeksiranje radikalov ustreza indeksiranju na Sliki 5; [c] n(C) – število ogljikovih atomov v R_5 stranski alifatski verigi; [d] (Wong in sod., 1996); [e] (Gobin in sod., 1995); [f] (McCullough in Merkal, 1982); [g] ns – v študiji ni specificirano; [h] (Snow, 1970)

2.3.5.2 Biosinteza

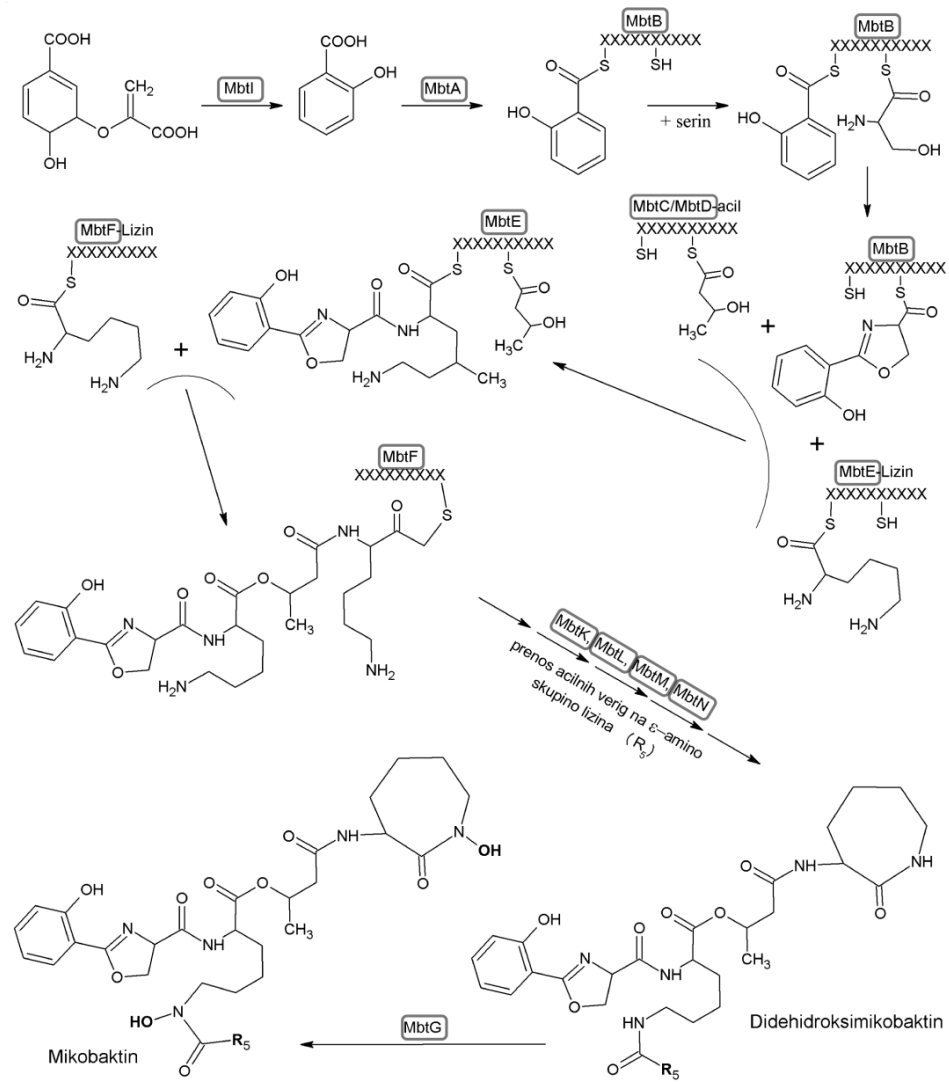
Tako MB kot cMB imata enako strukturno jedro, ki se sintetizira po skupni sintezni poti. Geni za sintezne encime so organizirani v dveh ločenih operonih. Prvi operon (*mbt-1*) vsebuje 10 genov (*mbtA-J*) in kodira encime za sintezo jedra mikobaktinov. Drugi operon (*mbt-2*) vsebuje 4 gene (*mbtK-N*) in kodira encime vpletene v dodajanje alifatskih verig na R_5 mesto v primeru hidrofobnih mikobaktinov (Preglednica 3).

Prekurzor za sintezo mikobaktina je salicilat, ki se sintetizira iz korizmata ali izokorizmata z od Mg^{2+} odvisne salicilat sintaze MbtI (Zwahlen in sod., 2007). Salicilat se aktivira z MbtA v acil adenilil, ki se kovalentno veže v ArCP domeno MbtB. Ta nadalje kondenzira salicilat s serinom, ga ciklizira v hidroksifeniloksazolin, ta pa se prenese na acil adeniliran lizinski ostanek, vezan na enem izmed dveh fosfopanteteinskih tiolov v PCP domeni MbtE (De Voss in sod., 2000). Vloga MbtC in MbtD zaenkrat še ni jasna, iz homologije se sklepa, da sodelujeta pri aktivaciji in prenosu β-hidroksi maščobnih kislin (pogosto butirat) na drugi fosfopanteteinski tiol v MbtE. Vloga slednjega je prenos rastoče mikobaktinske verige iz PCP domene na vezano maščobno kislino v ACP domeni (oboje na MbtE). MbtF nato katalizira prenos rastočega ogrodja z MbtE na lizin, ki je vezan na fosfopanteteinsko prostetično skupino MbtF (Quadri in sod., 1998) (Slika 6).

Preglednica 3: Geni operonov za sintezo mikobaktinov
Table 3: Genes of the mycobactin synthesis operons

***Gen*[a]**	***Anotacija*[a]**	***Vloga pri sintezi mikobaktinov* (zaporedna št. koraka v sintezi)[b]**
***mbt-1* operon**		
mbtI	Izokorizmat/salicilat sintaza	Sinteza salicilata iz korizmata (1)
mbtJ	Predvidena acetil hidrolaza	neznana
mbtA	Bifunkcionalna salicil-AMP ligaza/salicil-S-ArCP[c] sintetaza	Aktivacija salicilata z AMP (2)
mbtB	Feniloksazolin sintaza	ArCP in PCP[d]/Kondenzacija salicil-AMP s serinom hidroksifeniloksazolin (3)
mbtC	Poliketidna sintaza	ACP/povezava lizinskih ostankov z β-hidroksi kislino (4-7)
mbtD	Poliketidna sintaza	ACP/povezava lizinskih ostankov z β-hidroksi kislino (4-7)
mbtE	Peptidna sintaza	PCP[e] in ACP/Pripenjanje lizinskih ostankov (4-7)
mbtF	Peptidna sintaza	PCP/Pripenjanje lizinskih ostankov (4-7)
mbtG	Lizin-*N*-oksigenaza/hidroksilaza	Hidroksilacija ε-amino skupin lizinov (12)
mbtH	Hipotetični protein	neznana
***mbt-2* operon**		
mbtK (Rv1347c)	Lizin-*N*-acetil transferaza	Prenos dolgoverižnih acilnih verig na ε-amino skupino lizina na jedru mikobaktina (10)
mbtN (fadE14)	Acil-ACP dehidrogenza	Desaturacija acilnih verig (11)
mbtM (fadD33)	Acil – ACP ligaza	Aktivacija maščobnih kislin z AMP (8)
mbtL (Rv1344)	Acil nosilni protein	Nosilec AMP aktiviranih maščobnih kislin (9)

[a] iz baze NCBI za *M. tuberculosis* H37Rv, Genebank ID: NC_000962.2
[b] (De Voss in sod., 1999; Harrison in sod., 2006; Krithika in sod., 2006; Quadri in sod., 1998)
[c] ArCP - aroil nosilni protein; [d] ACP - acil nosilni protein; [e] PCP – peptidil nosilni protein



Slika 6: Predlagana pot biosinteze mikobaktina (De Voss in sod., 1999; Krithika in sod., 2006; Quadri in sod., 1998; Zwahlen in sod., 2007)
Figure 6: Proposed mycobactin biosynthesis pathway

Sledi MbtK kataliziran prenos z MbtM aktiviranih maščobnih kislin iz MbtL na ε-amino skupino centralnega lizina in desaturacija alifatske verige z MbtN (Krithika in sod., 2006). V zadnjem koraku MbtG hidroksilira oba lizina do hidroksilizinov (Slika 6) (Madigan in sod., 2012). Vloga MbtH in MbtJ zaenkrat še ni znana. Iz raziskav homolognih encimov se domneva, da MbtH stimulira adenilacijo aminokislin, ki jo katalizirajo NRPS (Felnagle in sod., 2010), vendar so mutacijske analize pokazale, da sinteza mikobaktina pri ΔmbtH mutantah *M. segmatis* ni motena (Chavadi in sod., 2011).

2.3.5.3 Vloga mikobaktinov v makrofagih

Mikobaktini omogočajo mikobakterijam preživetje in razmnoževanje znotraj makrofagov. Izražanje posameznih genov *mbt* operonov pri *M. tuberculosis* in *M. avium* podvrste *hominissuis* je povišana ob infekciji človeških makrofagov (Hou in sod., 2002; Schnappinger in sod., 2003; Talaat in sod., 2004). To povišanje je še izrazitejše v aktiviranih (IFN-γ) makrofagih (Schnappinger in sod., 2003). Delecijska mutanta ΔmbtB

M. tuberculosis ne proizvaja mikobaktinov in se ne more normalno razmnoževati v mediju brez železa, kot tudi ne v človeških makrofagih (De Voss in sod., 2000). Koncentracija železa v fagosomih z *M. tuberculosis* divjega tipa se močno poveča 24 ur po infekciji, medtem ko takšnega porasta ni videti pri ΔmbtB mutanti (Wagner in sod., 2005).

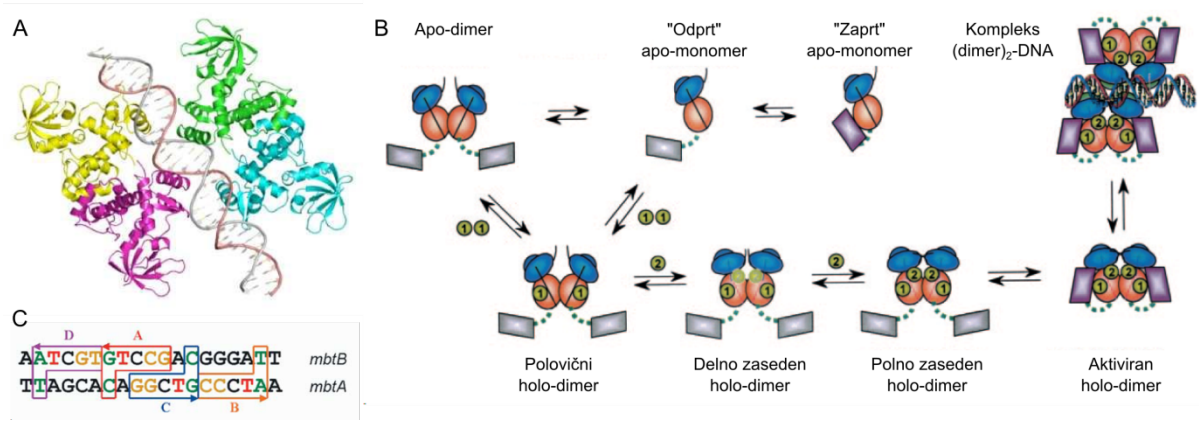
Karboksi-mikobaktini na osnovi višje afinitete kompetitivno vežejo železo iz transferina, feritina in laktoferina, tako iz zunanjih virov, kot notranjih zalog makrofaga (Gobin in Horwitz, 1996; Olakanmi in sod., 2002). Aktivirani makrofagi zmanjšajo endocitozo holo-transferina iz ekstracelularnega prostora, zato se privzem železa iz transferina zmanjša, poveča pa se prevzem iz drugih virov, kot sta laktoferin in citrat in privzem iz notranjih zalog feritina (Olakanmi in sod., 2004). Luo in sod. so pokazali, da ima poleg cMB lahko vlogo pri privzemu železa v makrofagih tudi MB, za katerega se sicer domneva, da je zasidran v celični steni mikobakterij. MB naj bi difundiral iz fagosomov in privzemal železo iz intracelularnih zalog makrofaga, nato pa se zasidral v lipidne vezikle, ki se s celičnim transportom zlivajo nazaj v fagosome, kjer se nahajajo mikobakterije (Luo in sod., 2005).

2.3.5.4 Regulacija operonov za sintezo mikobaktina

Transkripcija operonov za sintezo mikobaktina je pod kontrolo IdeR represorja (Gold in sod., 2001), homologa DtxR (*ang*. diphtheria toxin repressor) iz *Corynebacterium diphtheriae*, iz družine od železa odvisnih represorjev (Rodriguez in sod., 2002; Schmitt in sod., 1995). Inaktivacija gena za IdeR je letalna za *M. tuberculosis*, *ideR* mutanta lahko preživi le v kombinaciji s sekundarno mutacijo, ki povzroča omejeno sposobnost asimilacije železa (Rodriguez in sod., 2002). Od približno 150 genov, ki so regulirani z železom, naj bi IdeR reguliral okoli 60 genov pri bakterijah *M. tuberculosis* in *M. smegmatis* ter bakterijah podvrste MAP in MAH (Rodriguez in sod., 2002; Yellaboina in sod., 2006). Represor IdeR je vpleten tudi v odziv na oksidativni stres pri mikobakterijah. Inaktivacija IdeR pri bakterijah *M. tuberculosis* in *M. smegmatis* povzroča povečano občutljivost na H_2O_2 (Rodriguez in sod., 2002). Pri bakteriji *M. smegmatis* naj bi bil razlog nižja produkcija superoksid dismutaze (SodA) in katalazne peroksidaze (KatG), ki sodelujeta pri nevtralizaciji reaktivnih kisikovih spojin, vendar pa ne *sodA* ne *katG* nimata vezavnega mesta za IdeR, temveč sta pod FurA kontrolo. Pri bakteriji *M. tuberculosis* ravni proteinov SodA in KatG v ΔideR mutanti niso spremenjene. Vse to kaže na posredno vpletenost represorja IdeR v celično redoks ravnotežje in odziv na oksidativni stres.

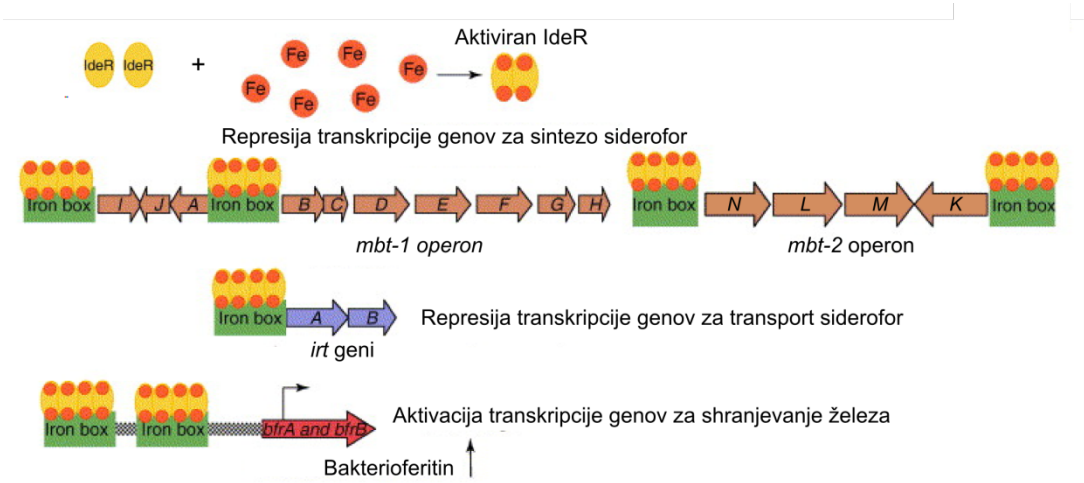
IdeR v prisotnosti železa deluje kot transkripcijski represor. Monomer je sestavljen iz treh domen: i) N-terminalne domene s heliks-zavoj-heliks (HTH) motivom za vezavo DNK, ii) dimerizacijske domene z večino ligandov za vezavo železa, in iii) SH3-podobne domene z dodatnimi ligandi za koordinacijo železa, ki je preko fleksibilnega linkerja vezana na dimerizacijsko domeno. Domena za dimerizacijo vsebuje dve mesti za koordinacijo Fe^{2+}. Dimerizacija se inducira z vezavo Fe^{2+} na prvo mesto že pri nižjih koncentracijah železa. Ko je v celici dovolj železa, sta obe mesti zasedeni, kar povzroči spremembo v konformaciji in močno poveča afiniteto IdeR homodimera za vezavo na operatorsko regijo (Chou in sod., 2004). Po dva homodimera se vežeta na nasprotni verigi prepoznavnega zaporedja, ki se nahaja v promotorju, približno 10 nukleotidov pred mestom začetka transkripcije. Na ta način IdeR domnevno blokira dostop RNK polimerazi do promotorskega mesta ter transkripcijo iz navzdolnjih genov (Slika 7). Zamenjava Asp177Lys v SH3-podobni domeni povzroči stabilizacijo DNK-vezavne konformacije

IdeR, zaradi česar se veže na operator tudi v odsotnosti železa in deluje kot konstitutivni represor reguliranih genov, kot so geni za sintezo mikobaktina (Manabe in sod., 2005). To povzroča atenuacijo virulence *M. tuberculosis* v mišjem modelu infekcije (Manabe in sod., 1999). Dimerizacijo IdeR *in vitro* katalizirajo tudi drugi dvovalentni kationi, kot so Co^{2+}, Ni^{2+} in Cd^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, s primerljivo afiniteto kot Fe^{2+}, vendar pa je vezava kationa v drugo mesto, ki omogoča vezavo IdeR na DNK, manj učinkovita v primerjavi s Fe^{2+}. Poleg tega le predhodna vezava Fe^{2+} v prvo mesto omogoča kooperativno vezavo Fe^{2+} v drugo mesto, kar kaže na Fe^{2+} kot glavni aktivator IdeR mediirane represije transkripcije (Chou in sod., 2004; Gold in sod., 2001; Wisedchaisri in sod., 2004).



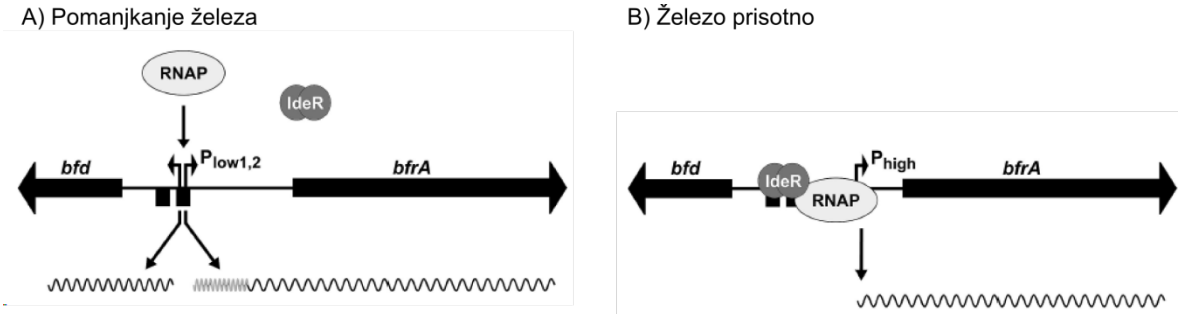
Slika 7: Mehanizem regulacije z IdeR represorjem (Chou in sod., 2004; Wisedchaisri in sod., 2004)
A – 3D model na podlagi X-ray določene strukture dveh homodimerov IdeR vezanih na prepoznavno mesto na DNK v promotorski regiji gena *mbtA* (PDB Id. št.: 1U8R); B – predvideni mehanizem aktivacije IdeR z železom (rumeni krogci, 1 – železo, ki se veže v prvo mesto in 2 – železo, ki se veže v drugo mesto na IdeR) (Chou in sod., 2004: 53561) ; C – prepoznavno mesto vezave IdeR v promotorju *mbtA*, z označenimi pentanukleotidi (ABCD), ki interagirajo s posameznim monomerom IdeR (Wisedchaisri in sod., 2004: 1162).

Dimer IdeR se veže na prepoznavno mesto na DNK preko dveh zaporednih pentanukleotidov na eni verigi DNK, medtem ko se drug dimer veže preko pentanukleotidov na komplementarni verigi (Slika 7C). Prepoznavna regija za vezavo je sestavljena iz 19 nukleotidov, ki ima po konsenzu zaporedje TTAGGTTAGGCTAACCTAA (Gold in sod., 2001). V mikobaktinskih operonih se nahajajo 4 vezavna mesta za IdeR. V *mbt-1* operonu imata *mbtA* in *mbtB* skupno IdeR vezavno mesto, vendar *mbtA* (in *mbtJ* pri *M. tuberculosis*) predstavlja ločeno transkripcijsko enoto od genov *mbtB-H*, katerih odprti bralni okvirji (ORF) so v nasprotni orientaciji. IdeR mesto je tudi v operatorju gena *mbtI,* kar postavlja sintezo salicilata z *mbtI* neposredno pod kontrolo železa. V operonu *mbt-2* je IdeR mesto pred genom *mbtL*, ki tvori transkripcijsko enoto z *mbM* in *mbtN*, medtem ko je *mbtK* v nasprotni orientaciji in ima lastno vezavno mesto za IdeR (Slika 8) (Gold in sod., 2001; Krithika in sod., 2006).



Slika 8: Regulacija *mbt*, *irt* in *bfr* operonov pri *M. tuberculosis* (Rodriguez, 2006: 323)
Na sliki avtorjev je napaka, in sicer gen *mbtN* bi moral biti med genoma *mbtM* in *mbtK*.

V nasprotju z represorsko vlogo pri regulaciji operonov za sintezo mikobaktina, ima IdeR pri regulaciji izražanja *bfrA* vlogo tako represorja kot aktivatorja. *bfrA* kodira za bakterioferitin, ki ima vlogo shranjevanja železa in zaščito pred prostim železom v primeru povišanih intracelularnih koncentracij. Izražanje *bfrA* je povečano v prisotnosti železa, kar je ravno obratno kar bi pričakovali za IdeR reguliran gen. Raziskave so pokazale, da sta v operatorski regiji *bfrA* dve tandemski vezavni mesti za IdeR in trije aktivni promotorji (Slika 9). V pogojih pomanjkanja železa IdeR ni vezan na prepoznavna mesta in transkripcija poteka s prvih dveh promotorjev (P_{low1} in P_{low2}), vendar pa količine prepisane mRNA s časom hitro upadajo, kar kaže na možno post-transkripcijsko regulacijo. Ob povišanju koncentracije železa se IdeR veže na obe vezavni mesti, s čimer se blokira transkripcija iz mest P_{low1} in P_{low2}, aktivira pa transkripcija s tretjega promotorja P_{high}. Domneva se, da je aktivacija (namesto represije) posledica večje oddaljenosti IdeR od P_{high} (97 bp) kot običajno (10 bp), in da IdeR preko interakcij pozitivno vpliva na dostop in vezavo RNK polimeraze (Slika 9). Transkripcija s P_{high} je precej bolj učinkovita kot s P_{low1} in P_{low2} skupaj, zaradi česar je transkripcija *bfrA* relativno povišana v prisotnosti in znižana ob pomanjkanju železa (Gold in sod., 2001).



Slika 9: Regulacija transkripcije *bfrA* pri *M. tuberculosis* (Gold in sod., 2001: 860)
RNAP – RNK polimeraza, *bfrA* – bakterioferitin, *P* - promotor

2.3.5.5 Mikobaktini pri bakterijah podvrste MAP

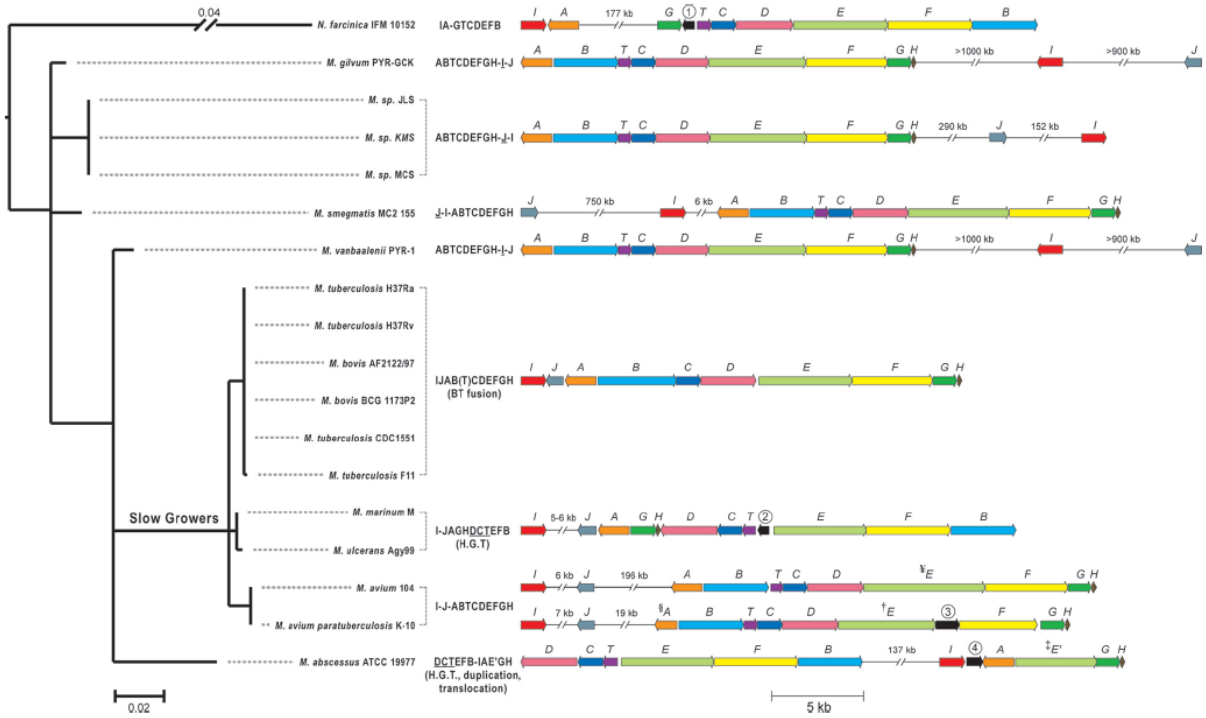
Ena izmed glavnih karakteristik, na podlagi katere se je v predgenomski eri izvajala identifikacija in ločitev bakterij podvrste MAP od sorodnih mikobakterij, je bila odvisnost

od eksogeno dodanega mikobaktina na *in vitro* gojiščih. Twort in Ingram sta leta 1912 prva uspela izolirati bakterijo podvrste MAP, vendar šele potem, ko sta v gojišče vključila steriliziran preparat iz kulture *Mycobacterium phlei*. Kasneje so ugotovili, da je bil dejavnik, ki je omogočal rast bakterij podvrste MAP, mikobaktin. Sprva so za gojenje bakterij podvrste MAP uporabljali mikobaktin iz bakterije *M. phlei*, kasneje pa so zaradi bolj učinkovitega spodbujanja rasti začeli pridobivati mikobaktin (tipa J) iz bakterije podvrste MAP, sev NADC 18 (ali ATCC 12227). Ta sev je domnevno izgubil odvisnost od mikobaktina v laboratorijskih pogojih in začel proizvajati lasten mikobaktin (Merkal in McCullough, 1982). Kasneje se je izkazalo, da je bil sev napačno klasificiran, genetske analize so pokazale odsotnost za MAP specifične IS*900*, sev pa je bil na novo klasificiran kot bakterija podvrste MAH, serovar 2 (Chiodini, 1993). Nekatere študije navajajo izgubo odvisnosti od mikobaktina pri več sevih MAP po parih precepljanjih v laboratorijskih pogojih in zagovarjajo, da gre za fenotipsko in ne za genotipsko karakteristiko (Barclay in Ratledge, 1983). Vendar pa je navidezna neodvisnost od mikobaktina lahko posledica prenosa membransko zasidranega mikobaktina, kar omogoča nadaljnjo rast MAP, kljub odsotnosti MB v svežem gojišču (Adúriz in sod., 1995; Lambrecht in Collins, 1992).

Zaenkrat ni znano, kaj je vzrok, da MAP ne proizvaja lastnega mikobaktina, kot tudi ne kako MAP pridobiva železo v okolju izven ali znotraj gostitelja in ali zato sploh potrebuje mikobaktin. Odsotnost mikobaktina pri MAP je lahko posledica okvar na različnih ravneh: i) na genetski ravni gre lahko za mutacije v *mbt* operonih, ki vodijo do nefunkcionalnih biosinteznih encimov; ii) na transkripcijski ravni kot posledica spremenjene regulacije operonov za sintezo mikobaktina, bodisi zaradi mutacij v regulatornih in intergenskih regijah ali zaradi sprememb v izražanju ter delovanju regulatorjev, ki vplivajo na transkripcijo *mbt* operonov, in iii) na post-transkripcijski ravni zaradi sprememb v dodatnih regulatornih dogodkih, ki vplivajo na stabilnost mRNK in translacijo genov za sintezne encime.

2.3.5.5.1 Primerjalna genomika in ohranjenost mbt operonov pri M. avium podvrste paratuberculosis

Primerjalna genomika kaže na ohranjenost *mbt* operonov pri večini mikobakterij z izjemo *M. leprae,* pri kateri so *mbt* operoni odsotni (Cole in sod., 2001). Kljub ohranjenosti se organizacija operona *mbt-1* med vrstami razlikuje. Pri hitro rastočih mikobakterijah je večinoma ohranjeno zaporedje ABCDEFGH medtem ko lokacija, zaporedje in orientacija *mbtI* in *mbtJ* variira, kar je posledica genskih translokacij in inverzij (Chavadi in sod., 2011). Na kompleksno preurejanje operona in horizontalni prenos genov med vrstami kaže tudi razporeditev *mbt* genov pri bakterijah *M. marinum*, *M. ulcerans* ter *M. abscessus*. Pri slednji je *mbtE* podvojen, manjka pa *mbtJ*, katerega vloga pri sintezi mikobaktina še ni razjasnjena. Pri počasi rastočih mikobakterijah iz filogenetske veje *M. tuberculosis* in *M. avium* je ohranjen vrstni red IJABCDEFGH (Chavadi in sod., 2011) (Slika 10). *M. avium* podvrste imajo v primerjavi z *M. tuberculosis mbtB* gen razcepljen na dva ORF (manjši ORF Chavadi s sod. označuje kot *mbtT,* ker je ohranjen tudi pri večini drugih mikobakterijah, vendar njegova vloga pri sintezi mikobaktina ni znana). Med *mbtA* in *mbtJ* pri *M. avium* podvrstah leži insercija, ki je pri MAH velika okoli 196 kb, pri MAP pa 19 kb. Insercija pri *M. avium* podvrstah je tudi med *mbtJ* in *mbtI* (5,7 kb pri MAH in 6,6 kb pri MAP) (Li in sod., 2005).



Slika 10: Ohranjenost *mbt-1* operona pri mikobakterijah v primerjavi s 16S rRNK filogenijo (Chavadi in sod., 2011: 5911)
Filogenetsko drevo (levo) je skonstruirano glede na zaporedje 16S rRNK.

Kljub ohranjenosti in enake organizacije *mbt-1* operonov pri MAH in MAP, pa le slednja ne proizvaja mikobaktina, zato se pojavlja vprašanje, če in v kakšni meri genetika prispeva k tej karakteristiki. Primerjave posameznih genov *mbt-1* operona so pokazale, da je *mbtA* zaradi delecije genomskega odseka LSP4 in insercije 19 kb pri MAP skrajšan in kodira za protein iz 400 aminokislin (aa), medtem ko je *mbtA* pri MAH kodira za 551 aminokislin dolg protein (565 aa pri *M. tuberculosis*). Manjkajoči del vsebuje ATP vezavni motiv, ki ima predvidoma vlogo pri aktivaciji salicilata v prvem koraku sinteze mikobaktinskega jedra. To bi lahko povzročilo nefunkcionalnost MbtA in posledično nesposobnost produkcije mikobaktina (Li in sod., 2005). Hibridizacijske analize genomov različnih sevov MAP so pokazale, da je genomski odsek LSP4 odsoten le pri govejih sevih MAP, medtem ko ovčji sevi delecije nimajo, zaradi česar je *mbtA* popolnoma ohranjen in enak kot pri MAH (Alexander in sod., 2009). To pomeni, da *mbtA per se* ne more biti odgovoren za okvaro v sintezi mikobaktina pri MAP, glede na to, da ovčji sevi kljub intaktnemu *mbtA* ne proizvajajo mikobaktina. Poleg *mbtA* so v primerjavi z MAH razlike tudi v genih *mbtE* in *mbtF*. Prvi je pri govejih sevih MAP krajši in razdeljen na dva ORF, vendar naj bi vse katalitske domene padle v prvi ORF. Tudi *mbtF* je skrajšan pri MAP, vendar naj bi kljub temu še vedno vseboval vsa katalitska mesta, ki jih vsebuje *mbtF* pri MAH (Chavadi in sod., 2011). Zaradi ohranjenosti vseh katalitskih mest, skrajšana *mbtE* in *mbtF* pri MAP verjetno nista razlog za okvaro v sintezi mikobaktina. Za iskanje vzrokov okvare na genetski ravni so vsekakor potrebne dodatne genomske analize, ki bodo vključile dodatne seve MAP, tako goveje kot ovčje (tipa I in III), ter primerjale tudi *mbt-2* operone in druge gene, vpletene v pridobivanje železa z mikobaktini.

2.3.5.5.2 Transkripcijska aktivnost in regulacija mbt operonov pri M. avium podvrste paratuberculosis

Do sedaj je bilo objavljenih zelo malo študij o transkripcijski aktivnosti *mbt* operonov pri MAP. Zhu in sod. niso zaznali povišanega izražanja genov *mbt* operonov v 120 urah po infekciji govejih makrofagov z govejimi in ovčjimi sevi MAP. Pri dveh izmed treh testiranih sevov MAP so sicer zaznali povišano izražanje homologov *mbtB* (MAP3742) in *mbtH* (MAP1872c), vendar pa noben izmed teh dveh homologov do sedaj ni bil impliciran v sintezi mikobaktina, prav tako nista regulirana z IdeR (Zhu in sod., 2008). Wu in sodelavci so zaznali povišano izražanje *mbtC* gena v odziv na različne stresorje *in vitro* (nizek pH, oksidativni in toplotni stres), vendar odziv na pomanjkanje železa ni bil analiziran (Wu in sod., 2007). Pred kratkim so Janagama in sod. pokazali, da je IdeR iz MAP (MAP2827) funkcionalen, t.j. se veže na prepoznavno mesto v promotorju *mbtB*, in ob pomanjkanju železa aktivira prepis iz *mbt-1* in *mbt-2* operona, v prisotnosti železa pa inhibira (Janagama in sod., 2010b; Janagama in sod., 2009). Aktivacija transkripcije *mbtB* z IdeR iz MAP je primerljiva aktivaciji z IdeR iz *M. tuberculosis*. IdeR iz ovčjih sevov vsebuje v primerjavi z IdeR iz govejih sevov substitucijo R91G, ki sicer ne vpliva na transkripcijo *mbt* operona (mbtB), povzroča pa spremenjeno regulacijo *bfrA*. IdeR iz *M. tuberculosis* in govejega seva MAP aktivira transkripcijo bfrA (z *M. tuberculosis* promotorjem) v prisotnosti železa, medtem ko IdeR iz ovčjega ne povzroči sprememb v izražanju. Interakcija ovčjega IdeR z ovčjim *bfrA* promotorjem celo inhibira transkripcijo *bfrA* v prisotnosti železa, ravno nasprotno kot pri *M. tuberculosis* in govejih sevih MAP. Isti avtorji so pokazali tudi povišano izražanje gena *mbtE* v človeških makrofagih, ki velja za okolje, kjer primanjkuje železa (Janagama in sod., 2009). Te raziskave nakazujejo, da je transkripcija z mikobaktinskih operonov (vsaj delno) aktivna in odzivna na železo, ne razkrivajo pa, kakšna je raven transkripcije in razmerje posameznih genov v primerjavi s sorodnimi mikobakterijami, ki proizvajajo mikobaktin, kot npr. bakterije podvrste MAH.

2.3.5.5.3 Proteomske analize izražanja encimov za sintezo mikobaktina pri M. avium podvrste paratuberculosis

Janagama in sod. so poleg transkriptomske analize bakterij podvrste MAP v gojišču z in brez železa izvedli tudi proteomsko analizo z iTRAQ metodo. Kljub temu, da so transkripcijske analize kazale povišano izražanje genov *mbt* operonov v gojišču 'brez' železa, proteomska analiza ni potrdila povišanega izražanja nobenega izmed encimov za sintezo mikobaktina (Janagama in sod., 2010b). Tudi raziskave proteomov z metodo 2D elektroforeze niso zaznale sprememb v izražanju Mbt proteinov med *in vivo* (nizka dostopnost železa) ter *in vitro* (visoka dostopnost železa) pogoji (Weigoldt in sod., 2011). Le ena študija navaja MbtN (MAP1553c) kot enega izmed desetih proteinov s povišanim izražanjem *in vivo* pri ovcah s paratuberkulozo v primerjavi z *in vitro* proteomom (Hughes in sod., 2007).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 EKSPERIMENTALNI ORGANIZMI

3.1.1 Mikobakterije

V poskusih smo uporabljali *M. avium* podvrste *paratuberculosis* sev CLIJ 623 (MAP CLIJ623) in sev 468/09 (MAP 468/09) ter *M. avium* podvrste *hominissuis*, sev 104 (MAH 104). MAP CLIJ623 je goveji sev tipa II in smo ga prejeli od organizacije CSIRO (Avstralija), kjer so celotnemu genomu omenjenega seva tudi določili nukleotidno zaporedje (Genebank ID: 334905725). MAP 468/09 smo prejeli iz Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Gre za slovenski izolat iz goveda, obolelega za paratuberkulozo (tip ni bil določen). MAH 104 smo prejeli iz centra za tuberkulozne raziskave John Hopkins in je bil izoliran leta 1983 v ZDA iz pacienta okuženega s HIV.

Za optimizacijo postopka izolacije DNK iz mikobakterij smo uporabljali tudi tipski sev *M. avium* podvrste *avium*, 25291, ki smo ga pridobili iz zbirke mikroorganizmov ATCC (American type culture collection, ZDA).

3.1.2 Druge bakterije

Za optimizacijo postopka DNK izolacije iz mikobakterij smo za primerjavo učinkovitosti izolacije uporabili bakterijo *Staphylococcus aureus* iz interne zbirke mikroorganizmov.

Za prehranjevalne poskuse z amebami smo v kontrolnih poskusih uporabljali bakterijo *Escherichia coli*, prav tako iz interne zbirke mikroorganizmov.

3.1.3 Amebe

V prehranjevalnih poskusih z mikobakterijami smo uporabljali amebe izolirane iz okolja ter amebo iz rodu *Acanthamoeba*, ki smo jo prejeli od Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani in je bila izolirana iz človeške očesne mrežnice.

3.2 GOJENJE

3.2.1 Gojenje mikobakterij

3.2.1.1 Gojišča za vzdrževanje kultur

Za vzdrževanje kultur smo uporabljali predpripravljene poševnike s Herrold's egg yolk agarjem z (za kulture MAP) ali brez mikobaktina J (za kulture MAH in MAA) (Beckton Dickinson, ZDA).

Tekoče kulture smo vzdrževali v Middlebrook 7H9 gojišču, z dodatkom 10 % (v/v) ADC dopolnila (oboje Beckton Dickinson, ZDA), detergenta Tween 80 (0,5 g/l, Sigma-Aldrich, ZDA), in mikobaktina J (2 mg/l, ID-VET, Francija). Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca.

3.2.1.2 Gojišča za poskuse z amebami

V poskusih z amebami smo za gojenje mikobakterij uporabljali Middlebrook 7H10 agar z dodatkom OADC dopolnila (oboje Beckton Dickinson, ZDA), glicerola (5ml/l, Sigma-Aldrich, ZDA) in mikobaktina J (2 mg/l, ID-VET, Francija). Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca.

3.2.1.3 Gojišče za poskuse z različnimi koncentracijami železa

Za poskuse gojenja pri različnih koncentracijah železa, smo za osnovo uporabljali modificirano Sauton's gojišče (na liter 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4.7H_2O$, 2,0 g citronske kisline, 60 ml glicerola, 4,0 g L-asparagina, 1 mg $ZnSO_4.7H_2O$, 250 mg Tween 80, pH 6,8). Koncentracija železa v osnovnem gojišču, določena s ferozinsko metodo po (Viollier in sod., 2000), je bila <0,5 μM. Tako nizke koncentracije železa povzročijo pri mikobakterijah fenotipski odziv na pomanjkanje železa (Sritharan in sod., 2006), zato smo osnovno gojišče uporabljali za rast mikobakterij v pogojih pomanjkanje železa. Za rast mikobakterij v prisotnosti železa, smo osnovnemu gojišču dodali $FeCl_3$, da je bila končna koncentracija železa v gojišču 100 μM, kar je v območju koncentracij železa v klasičnih gojiščih za mikobakterije (7H9/10, Herrolds Egg Yolk, Loewenstein-Jensen).

3.2.1.4 Preverjanje čistosti mikobakterijskih kultur

Tekom poskusov smo redno preverjali identiteto kultur in morebitno kontaminacijo. Prisotnost drugih bakterij smo preverjali z restrikcijsko analizo pomnožka gena za 16S rRNK in Ziehl-Neelsen barvanjem za analizo pod svetlobnim mikroskopom.

Ker smo v laboratoriju istočasno delali z različnimi podvrstami bakterije *M. avium*, je obstajala možnost kontaminacije kultur z drugimi podvrstami. Kontaminacijo smo preverili s pomnoževanjem specifičnih mikobakterijskih insercijskih zaporedij IS*900*, IS*901*, IS*1245* s klasično PCR. IS*900* je značilno za MAP, IS*1245* za MAH in MAA, IS*901* pa samo za MAA.

3.2.2 Gojenje ameb

3.2.2.1 Gojišča za amebe

Primarna izolacija
Za primarno izolacijo ameb smo uporabljali NNA (*ang.* **N**on **N**utrient **A**gar). Pripravili smo si plošče iz prečiščenega NN agarja (LP0011, Oxoid, 15 g/l) v Prescott-James raztopini (PJ, glej Preglednica 4) debeline do 3 mm za lažje opazovanje plošč s svetlobnim mikroskopom.

Preglednica 4: Sestava Prescott-James-ove raztopine
Table 4: Formulation of Prescott-James solution

Založne raztopine (1000×)		
I	***II***	***III***
0,433 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,512 g K_2HPO_4	0,280 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0,162 g KCl		
v 100 ml deionizirane H_2O	v 100 ml deionizirane H_2O	v 100 ml deionizirane H_2O
Delovna raztopina = 1 ml raztopine I, II in III na liter deionizirane vode		

Vzdrževanje amebnih kultur

Aksenične kulture ameb iz rodu *Acanthamoeba* smo vzdrževali v tekočem PPG gojišču. Gojišče smo pripravili po receptu CCAP (**C**ulture **C**ollection of **A**lgae and **P**rotozoa, VB, http://www.ccap.ac.uk/media/documents/PPG.pdf) na sledeč način:

1. Raztopili smo 15 g proteoznega peptona (L85, Oxoid, Thermo Fischer Scientific, ZDA) v 1 l raztopine PAS, pH mora biti 7,0 ±0,1 (Preglednica 5)
2. Avtoklavirali smo 15 min pri 121 °C.
3. Ko se je gojišče ohladilo, smo aseptično dodali 50 ml sterilno filtrirane 2 M raztopine D-glukoze (končna koncentracija 0,1 M oziroma 18 g/l).

Preglednica 5: Sestava PAS (Page's Amoeba Saline) raztopine
Table 5: Formulation of PAS (Page's Amoeba Saline) solution

Založna raztopina 1	*Založna raztopina 2*	*Delovna raztopina*
12 g NaCl	14,2 g Na_2HPO_4	5 ml založne raztopine 1
0,4 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	13,6 g KH_2PO_4	5 ml založne raztopine 2
0,6 g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$	500 ml deionizirane vode	990 ml deionizirane vode
500 ml deionizirane vode		

Ksenične kulture ameb iz rodov *Hartmannella* in *Acanthamoeba* smo vzdrževali na NN agarju, katerega smo prevlekli s suspenzijo živih bakterij vrste *E. coli*. Suspenzijo smo pripravili tako, da smo prekonočno kulturo *E. coli* v LB dvakrat centrifugirali 3 min pri 5000×g in sprali v PJ ter redčili do OD_{600} = 0,2. Po 30 µl tako pripravljene suspenzije bakterij smo nanesli na suhe NNA plošče in počakali, da se je tekočina vpila. Tako pripravljene plošče so bile primerne za inokulacijo.

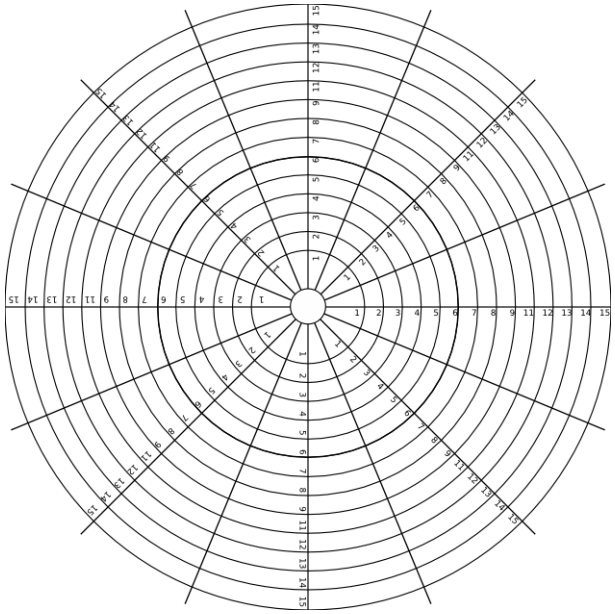
3.2.2.2 Izolacija ameb iz okoljskih vzorcev

Izolacijo smo izvedli po F. C. Page (Page, 1976). Pripravili smo si NN agar plošče. Tekoče vzorce (gnojnica, voda) smo nanesli na rob NNA plošče (500 µl) in jo nagnili vertikalno, da je tekočina stekla čez ploščo. V primeru trdnih vzorcev (feces, sediment) smo 0,5 g vzorca najprej zmešali z 2 ml sterilne PJ raztopine in nato s prirezanim tipsom prenesli cca 500 µl suspenzije vzorca na rob NNA plošče ter jo ponovno nagnili vertikalno, da je kapljica spolzela čez ploščo. Plošče smo zatesnili z laboratorijskim filmom (parafilm, Bemix, ZDA) in inkubirali 1 teden na sobni temperaturi (ST) v temi ter dnevno preverjali pojav ameb na NNA ploščah s svetlobnim mikroskopom (fazni kontrast). S koničastim skalpelom smo nato sterilno izrezali košček agarja, ki je vseboval samo eno amebno celico,

in ga prenesli na sveže NN agar plošče z *E. coli* premazom. Plošče smo zatesnili s parafilmom in inkubirali 1 teden na ST v temi ter vsakodnevno spremljali sestavo amebne združbe na ploščah. V primeru, da smo še vedno dobili mešane populacije (izrez samo ene celice je lahko precej težaven), smo ponavljali postopek dokler nismo dobili čistih klonalnih kultur. Klonalnost kulture smo ocenili z morfološko analizo pod mikroskopom in preverili tudi s pomnoževanjem in kloniranjem gena za 18S rRNK.

3.2.2.3 Poskusi prehranjevanja ameb z mikobakterijami

Sposobnost prehranjevanja izoliranih ameb z MAP in MAH smo preverili s poskusom razmnoževanja in hitrostjo migracije na NNA ploščah, prekritih z različnimi bakterijami. Pripravili smo si NNA agar v PJ raztopini v petrijevkah in na zunanje dno petrijevke prilepili prozorno folijo, katero smo predhodno potiskali s koncentričnimi krogi (Slika 11). Prvi notranji krog je imel premer 5 mm in je označeval mesto inokulacije. Prvi naslednji koncentrični krog je imel premer 15 mm, nato pa so si krogi sledili na vsake 2,5 mm do roba petrijevke, vsak je bil označen z zaporedno številko. Inokulacijo kultur smo izvedli v centralni koncentrični krog, nato pa opazovali širjenje ameb navzven s štetjem celic v posameznem kolobarju.



Slika 11: Shema folije za določanje hitrosti migracije ameb
Figure 11: Scheme of foil used for determination of amoeba migration speed

Pripravili smo si suspenzije bakterijskih kultur *E. coli*, MAH 104 in MAP 468/09. *E. coli* smo gojili preko noči v tekočem LB gojišču s stresanjem na 37 °C, MAH 104 in MAP 468/09 pa v tekočem Sauton's z železom (+ mikobaktin J, 2 mg/l, v primeru MAP 468/09) na 37 °C do srednje eksponente faze. Kulture smo centrifugirali pri 5000×g in 2-krat sprali s sterilno PJ raztopino. Tako pripravljene suspenzije smo nadalje redčili s PJ raztopino do OD_{600} 0,20, nato pa prešteli bakterijske celice v Neubauer-jevi komori za štetje celic. Glede na rezultate štetja smo suspenzije dodatno redčili s PJ raztopino, da smo dosegli enake koncentracije bakterij v vseh suspenzijah. Po 30 µl bakterijske suspenzije smo nanesli v center NNA plošč in počakali, da se vpije. Nato smo plošče v center inokulirali še z amebami. Inokulat ameb je bil pripravljen na enega izmed sledečih dveh načinov:

i)
- En ml aksenične kulture ameb v PPG smo centrifugirali 3 min na 250×g in dvakrat sprali s PJ raztopino;
- Koncentracijo ameb v PJ raztopini smo določili z Neubauer komoro za štetje celic pod mikroskopom;
- Amebe smo ustrezno redčili, da smo lahko inokulirali plošče v razmerju amebe:bakterije od $1:10^3$ do $1:5\times10^3$ z inokulacijskim volumnom od 5 do 20 µl.

ii)
- Za inokulacijo smo uporabili košček agarja z amebami, ki so zrasle na NNA agar ploščah brez *E. coli* in so bile oddaljene od mesta inokulacije vsaj 2 cm (da niso vsebovale bakterij, ki smo jih morebiti prenesli iz predhodnih kseničnih kultur);
- Število ameb smo ocenili z določitvijo površinske gostote celic na osnovnem NNA agarju, kar smo pomnožili s površino izrezanega koščka agarja (cca 4-6 mm^2), ki smo ga uporabili za inokulacijo; razmerje amebe:bakterije se je gibalo med $1:5\times10^4$ do $1:10^5$;
- Košček agarja z amebami smo na koncu omočili še s kapljico PJ raztopine, da smo amebam omogočili boljši kontakt s površino agarja.

Tako inokulirane plošče smo zatesnili s parafilmom in jih inkubirali pri 20 °C v temi ter vsakodnevno prešteli amebe na posameznih koncentričnih krogih s svetlobnim mikroskopom Zeiss Axio Observer Z1, pri 100-kratni povečavi s faznim kontrastom.

3.2.2.4 Intracelularno preživetje mikobakterij v amebah

Za poskuse preživetja smo uporabili kulturo ameb *Acanthamoeba sp.* KC (iz očesne mrežnice) in kulture bakterij MAH 104, MAP 468/09 in *E.coli*. Bakterijske suspenzije za inokulacijo smo pripravili enako kot opisano v prejšnjem poglavju. Amebne inokulate smo pripravili enako kot opisano pod točko ii) v prejšnjem poglavju. Za gojenje smo si pripravili kompozitne plošče iz NN agarja in 7H10 (Beckton Dickinson, ZDA) agarja. Za ta namen smo najprej pripravili plošče iz NN agarja. S sterilnim kosom aluminijaste cevi z ostrimi robovi (2d=2 cm) smo izrezali okrogel kos agarja in ga prenesli v center nove sterilne petrijevke. Nato smo si pripravili 7H10 agar po navodilih proizvajalca, dodali mikobaktin J (2 mg/ml) in ga previdno dolili v petrijevke, ki so vsebovale krožni izsek NN agarja. Pri tem smo pazili, da 7H10 agar ni prelil koščka NN agarja. Na krožen košček NN agarja smo nanesli suspenzijo posamezne bakterijske kulture, in ko se je dobro vpila, smo dodali košček NN agarja z amebami ter zalili s kapljico PJ raztopine. Gojišča smo pustili 4 dni na sobni temperaturi, nato pa smo petrijevke zatesnili s parafilmom in jih inkubirali še 10 dni na 37° C. Z mikroskopom smo dnevno spremljali preživetje ameb in morebitno pojavljanje kolonij mikobakterij izven mesta inokulacije (torej na 7H10 agarju), bodisi zaradi lize ameb ali izstopa morebitnih intracelularnih mikobakterij v različnih fazah rasti ameb.

3.3 BARVANJE PO ZIEHL-NEELSNU

Kontrola kontaminacije kultur je vključevala barvanje po Ziehl-Neelsnu, ki omogoča ločitev mikobakterij od večine ostalih, morebitno prisotnih kontaminirajočih bakterij. Zaradi strukture celične stene namreč, mikobakterije po spiranju s kislino zadržijo rdeče

barvilo karbol fuksin, medtem ko večina drugih bakterij ne, zaradi česar se po barvanju z metilenskim modrilom obarvajo modro.

1. 1 ml kulture smo centrifugirali 5 min pri 5.000×g in gojišče odlili;
2. Pelet smo resuspendirali v fiziološki raztopini (0,9 % NaCl) in 5-10 µl prenesli na objektno stekelce in razmazali v tanko plast;
3. Pustili smo, da so je razmaz posušil (15-30 min) in ga fiksirali tako, da smo šli z objektnim steklom (razmaz zgoraj) čez plamen gorilnika (3-4 s, 3-krat);
4. Objektno steklo smo postavili na aluminijasto ploščo (razmaz zgoraj), ki smo jo pred tem segreli na grelcu na cca 60-80 °C.
5. Na objektno steklo smo s 5 ml pasteurko nakapljali par kapljic raztopine karbol fuksina po Ziehl-Neelsnu (Sigma-Aldrich, ZDA) in pokrili s filtrirnim papirjem Whatman N°1, obrezanim na velikost objeknega stekla. Barvali smo 5 min in sproti po kapljicah dodajali svež karbol fuksin (pazili smo, da se objektno steklo ni posušilo in da nam karbol fuksin ni zavrel);
6. Nato smo pustili, da se je objektno steklo ohladilo, in ga previdno sprali z vodovodno vodo.
7. Objektno steklo smo nato trikrat sprali z namakanjem v raztopini kislega alkohola (1% HCl (v/v) v 70% etanolu).
8. Objektno steklo smo sprali z vodovodno vodo in ponovili spiranje s kislim alkoholom, dokler ni bilo več vidnih madežov od karbol fuksina.
9. Objektno steklo smo odcedili na papirnati brisački in jih postavili na stojalo ter po kapljicah dodali raztopino metilenskega modrila (0,14 % (w/v) v destilirani vodi).
10. Inkubirali smo 1 min na ST, nato pa odlili barvilo in sprali z vodovodno vodo ter pustili objektno steklo, da se je posušilo na zraku.

Tako obarvane preparate smo pregledali za prisotnost rdeče/rožnato obarvanih mikobakterij ali morebitno modro obarvanih kontaminirajočih bakterij s svetlobnim mikroskopom Zeis Axio Observer Z1, pri 1000-kratni povečavi z imerzijskim oljem.

3.4 VZORČENJE

Za namene analize prisotnosti IS*900* in IS*1245* v okolju smo vzorčili ožji in širši okolici dveh slovenskih kmetij (Kmetija A in Kmetija B), kjer je bila predhodno ugotovljena obolelost goveda za Johne-jevo boleznijo, ki jo povzroča *Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis*. Vzorčenje na Kmetiji A smo izvedli 3-krat, maja in julija 2010 ter novembra 2011, na Kmetiji B pa 2-krat, maja 2010 in julija 2011. Zajeli smo vzorce gnojnice, stelje, fecesa, silaže, vode iz napajalnikov, pašnih površin in okoliških vodnih virov (celoten popis vzorcev v Prilogi C). Vzorce smo zajemali s steriliziranim priborom v sterilne 1 l plastenke (Golias, Slovenija) ali 50 ml centrifugirke (TPP, Švica). Vzorce smo do obdelave hranili na 4 °C.

3.5 METODE ZA IZOLACIJO DNK

3.5.1 Izolacija DNK iz čistih kultur

3.5.1.1 Izolacija mikobakterijske DNK

Za izolacijo DNK iz čistih mikobakterijskih kultur (kadar izkoristek DNK ni bil pomemben) smo uporabljali kit SmartHelix™ EZextract (Sekvenator d.o.o., Slovenija) po naslednjem modificiranem protokolu:

1. 100 do 500 µl kulture smo centrifugirali 5 min pri 10.000×g;
2. Odpipetirali smo supernatant in pelet resuspendirali v 100 µl SmartHelix™ EZextract mešanice z mešanjem na vorteksu;
3. Inkubirali smo v vreli vodi 15 min, nato pa ohladili na ledu (5 min);
4. Centrifugirali smo 10 min pri 10.000×g in 50 µl supernatanta prenesli v novo epico;
5. Tako pripravljeno DNK smo shranili na -20 °C do uporabe.

3.5.1.2 Izolacija amebne DNK

V primeru izolacije DNK iz ameb smo iz NNA plošče s klonalno populacijo ameb najprej izrezali košček agarja z večjo gostoto celic, ga potopili v 100 µl SmartHelix™ EZextract mešanice in temeljito premešali na vorteksu. Košček agarja smo nato sterilno odstranili in izolacijo DNK nadaljevali s korakom 3, kot opisano v prejšnjem poglavju.

3.5.2 Optimizacija protokolov za izolacijo mikobakterijske DNK iz okoljskih vzorcev

V prvem koraku smo želeli izbrati in prilagoditi ustrezno metodo, ki bi omogočala čim večje izkoristke izolacije mikobakterijske DNK. Za osnovo smo uporabili metodi SmartHelix™ DNAid in SmartHelix™ Classic (oboje od Sekventaor d.o.o., Slovenija). Obe metodi sta namenjeni za izolacijo DNK iz kompleksnih okoljskih vzorcev. Za primerjavo smo testirali tudi metodo Smarthelix™ EZextract (Sekvenator d.o.o., Slovenija). Za testiranje izolacije DNK smo uporabili 0,5 ml teden dni stare kulture (OD~0,8) *Mycobacterium avium* podvrste *avium* (MAA), sev ATCC 25291 in za primerjavo 0,5 ml prekonočne kulture (OD~1,1) *Staphylococcus aureus*.

Osnovni protokoli:

i) SmartHelix™ DNAid kit

A. (Predpriprava vzorca) V 1,5 ml epice z navojem smo odpipetirali 0,5 ml bakterijske kulture, centrifugirali 5 min pri 10.000×g in odlili supernatant;
1. Dodali smo 400 µl D-stroyer pufra s proteinazo K in eno enoto SmartHelix™ steklenih kroglic, resuspendirali na vorteksu;
2. Stresali smo 2 min v stresalniku (*ang.* bead-beater) Mill Mix 20 (Tehtnica, SLO) na 30 Hz;

3. Inkubirali 15 min pri 56 °C;
4. Stresali 2 min v stresalniku Mill Mix 20 na 30 Hz;
5. Ponovili smo inkubacijo 15 min pri 56 °C in nato stresanje 2 min v stresalniku Mill Mix 20 na 30 Hz ;
6. Vzorce smo nato inkubirali v vreli vodi 10 min;
7. Ohladili na sobno temperaturo (ST) (v zamrzovalniku, 3 min) in centrifugirali 5 min na 10.000×g;
8. Supernatant smo pazljivo prenesli v nove epice (izmerili smo tudi volumen mešanice);
9. Dodali smo 3 volumne B-pufra, vorteksirali in prenesli 700 µl vzorca v DNAid kolone in inkubirali 1 min na ST;
10. Centrifugirali smo 1 min pri 16.000×g;
11. Filtrat smo zavrgli in na isto DNAid kolono dodali še preostali vzorec, inkubirali 1 min na ST, centrifugirali 1 min na 16.000×g;
12. Filtrat smo zavrgli in dodali 600 µl W-pufra;
13. Centrifugirali 1 min na 16.000×g;
14. Filtrat smo zavrgli, dodali še 500 µl W-pufra in centrifugirali 5 min pri 16.000×g;
15. Filtrat smo ponovno zavrgli in še enkrat centrifugirali 1 min pri 16.000×g;
16. Kolone smo prestavili v nove 1,5 ml safe-lock epice, dodali 100 µl E-pufra in inkubirali 1 min na ST;
17. Centrifugirali 1 min na 16.000×g;
18. Eluirano DNK smo shranili pri -20 °C.

ii) SmartHelix™ Classic kit

A. (Predpriprava vzorca) V 1,5 ml epice z navojem smo odpipetirali 0,5 ml bakterijske kulture, centrifugirali 5 min pri 10.000×g in odlili supernatant;
1. V epico z vzorcem smo dodali eno enoto steklenih kroglic, 300 µl raztopine Sol II in 375 µl raztopine Sol III ter dobro premešali na vorteksu;
2. Stresali smo 2 min v stresalniku Mill Mix 20 (Tehtnica, SLO) pri hitrosti 30 Hz;
3. Centrifugirali 5 min pri 10.000×g in zgornjo vodno fazo prenesli v novo 1,5 ml epico;
4. Stresanje smo ponovili še 2-krat:
    a. K vzorcu smo dodali 300 µl Sol II in 375 µl Sol III, vorteksirali in stresali 2 min v stresalniku Mill Mix 20 pri hitrosti 30 Hz;
    b. Vsakič smo prenesli zgornjo vodno fazo v zbiralno 1,5 ml epico;
5. Vodno fazo smo razdelili v več epic, tako da je bilo v vsaki maksimalno 500 µl;
6. Proteine smo dodatno odstranili z dodatkom 300 µl raztopine Sol III, vorteksirali in centrifugirali 5 min pri 10.000×g;
7. Supernatant smo prenesli v novo epico in dodali ¼ volumna Sol IV in 2 volumna hladne Sol V, premešali z obračanjem in inkubirali 1 h pri -20 °C;
8. Nato smo centrifugirali 30 min pri 16.000×g in 4 °C, previdno odlili supernatant in peletu dodali 750 µl raztopine Sol VI;
9. Centrifugirali smo 15 min pri 16.000×g in 4 °C, previdno odpipetirali supernatant, pelet pa posušili ob gorilniku (5-10 min);
10. Pelet smo resuspendirali v 30 µl raztopine Sol I.

Testirani protokoli v fazi optimizacije:

i) SmartHelix™ Classic kit (Sekvenator d.o.o., Slovenija), po protokolu proizvajalca – oznaka **SH**;
ii) Smarthelix™ Ezextract kit (Sekvenator d.o.o., Slovenija), po protokolu proizvajalca – oznaka **EZ**;
iii) SmartHelix™ DNAid kit (Sekvenator d.o.o., Slovenija), po protokolu proizvajalca, vendar le z enkratnim (prvim po vrsti) stresanjem na stresalniku – oznaka **SD1x**;
iv) SmartHelix™ DNAid kit (Sekvenator d.o.o., Slovenija), po protokolu proizvajalca – **SD3x**;
v) SmartHelix™ DNAid kit (Sekvenator d.o.o., Slovenija), po protokolu proizvajalca, le da smo stresanje v stresalniku izvedli le enkrat, kot pod iii), namesto čiščenja čez kolone pa smo DNK očistili s fenol-kloroform-izoamilalkoholom (FKI, 25:24:1, Sigma-Aldrich, ZDA) in DNK precipitirali z etanolom (EtOH), kot sledi;
1. Po koraku 8 osnovnega protokola smo dodali 300 µl FKI, vorteksirali in centrifugirali 5 min pri 10000×g. Supernatant smo prenesli v novo epico;
2. Nadaljevali smo s koraki 7-10 po protokolu Smarthelix Complex Samples DNA Extraction Kit;
Oznaka tega 'hibridnega' protokola je **SD-SH**;
vi) SmartHelix™ DNAid kit (Sekvenator d.o.o., Slovenija), po protokolu proizvajalca, le da smo stresanje v stresalniku izvedli le enkrat, kot pod iii), supernatant iz koraka 8 pa smo pred čiščenjem čez kolone, očistili še s FKI, kot opisano pod v), točka 1 – oznaka **SD1xFKI**.

DNK iz kulture *Staphylococcus aureus* smo izolirali samo z metodami i), ii) in iii), DNK iz kulture MAA pa z vsemi metodami.

Izolirano DNK smo kvantificirali Qubit 1.0 fluorometrom z uporabo Quant-it DNA Assay kit, Broad Range (oboje od Life Technologies, Invitrogen, ZDA). Kvaliteto DNK smo preverili z gelsko elektroforezo na 1 % agaroznem gelu.

3.5.3 Izolacija DNK iz okoljskih vzorcev in govejega fecesa

3.5.3.1 Trdni vzorci in tekočinski vzorci, ki so vsebovali veliko suspendiranih delcev

Izolacijo iz trdnih vzorcev (npr. sediment, feces, biofilmi, itn.) in tekočinskih vzorcev, ki so vsebovali veliko suspendiranih delcev (npr. gnojnica, odpadne vode z biofilmi, itn.), smo izvedli po protokolu SmartHelix™ DNAid kit (Sekvenator d.o.o., Slovenija). Predpripravo vzorcev (A) smo izvedli na sledeč način:

A. V 1,5 ml epice z navojem smo zatehtali okoli 0,5 g trdnih vzorcev (natančno maso smo si zabeležili). Tekočinske vzorce (1 ml), ki so vsebovali veliko suspendiranih delcev, pa smo najprej centrifugirali 5 min pri 10.000×g in odlili supernatant.

Nadaljevali smo s 1. korakom po protokolu proizvajalca.

3.5.3.2 Tekočinski vzorci, ki so vsebovali malo suspendiranih delcev

Izolacijo iz tekočinskih vzorcev, ki so vsebovali malo suspendiranih delcev (npr. voda iz napajalnikov, vodotokov, itn.), smo izvedli po protokolu SmartHelix™ Classic kit (Sekvenator d.o.o., Slovenija).
Predpripravo vzorcev (A) smo izvedli na sledeč način:

A. Vodne vzorce smo najprej filtrirali čez sterilne filterske enote s PES filtri za enkratno uporabo (premer por 0,22 µm, Nalgene, Thermo Scientific, ZDA). Volumen filtriranega vzorca smo si zabeležili. Filter smo sterilno razrezali s škarjicami in ga prestavili v dve 2 ml epico z navojem.

Nadaljevali smo s 1. korakom po protokolu proizvajalca.

3.5.4 Izolacija plazmidne DNK

Izolacijo plazmidov iz transformiranih *E. coli* smo izvedli z modificirano metodo alkalne lize (Sambrook in Russell, 2001):

1. Pozitivne transformante (po 2 transformanti na sklonirani gen) smo gojili preko noči v 2 ml epicah v 1 ml LB gojišča z ampicilinom (100 mg/l);
2. Centrifugirali 5 min pri 10.000×g in odlili supernatant;
3. Pelet smo resuspendirali v 100 µl ledeno hladne raztopine I (50 mM glukoza, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0);
4. Dodali smo 200 µl raztopine II (0,2 M NaOH, 1% NaDS (w/v)) in premešali z rahlim obračanjem;
5. Dodali smo 150 µl ledeno hladne raztopine III (60 ml 5 M kalijev acetat, 11,5 ml glacialne ocetne kisline, 28,5 ml H_2O), kjer je prišlo do precipitacije, rahlo premešali z obračanjem in pustili stati na ledu 5 min;
6. Nato smo centrifugirali 5 min pri 16.000×g pri 4 °C in supernatant prenesli v svežo epico;
7. Dodali smo 2 volumna 96 % etanola in pustili precipitirati na 2 min na ST;
8. Centrifugirali smo pri 5 min pri 16.000×g pri 4 °C in odlili supernatant;
9. Dodali smo še 1 ml 70 % etanola, premešali z obračanjem in ponovno centrifugirali 5 min pri 16.000×g pri 4 °C;
10. Supernatant smo previdno odlili in ostanke popivnali s papirnato brisačo, pelet pa posušili ob gorilniku (3-5 min);
11. Pelet smo resuspendirali v 50 µl deionizirane vode.

3.6 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)

3.6.1 Pomnoževanje IS*900*, IS*1245* in IS*901* za preverjanje čistosti kultur

Reakcijske mešanice za pomnoževanje insercijskih zaporedij so vsebovale 5 µl 10×PCR pufra, 3 µl $MgCl_2$ (25 mM), 2 µl (IS*901*, IS*1245*) ali 1,5 µl (IS*900*) dNTP (2,5 mM vsak), po 1 µl (IS*901*, IS*1245*) ali 1,5 µl (IS*900*) vsakega začetnega oligonukleotida (10 µM, Preglednica 6), 0,3 µl AmpliTaq polimeraze (5 U/µl), 1 µl DNK in deionizirane vode do 50 µl (vsi reagenti od Applied Biosystems, ZDA, razen začetni oligonukleotidi od Jena

Bioscience, NEM). Pogoji pomnoževanja: začetna denaturacija 2 min pri 95 °C, 30 ciklov po 45 s pri 95 °C, 45 s pri 62 °C (IS*900*) ali 56 °C (IS*901*) ali 59 °C (IS*1245*), 45 s (IS*900* in IS*1245*) ali 80 s (IS*901*) pri 72 °C, in končno podaljševanje 5 min pri 72 °C.

Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi uporabljeni pri pomnoževanju insercijskih zaporedij za preverjanje čistosti kultur
Table 6: Primers for amplification of insertion sequences when checking for contamination

Oznaka ZO	*Zaporedje 5'→3'*	*Tarča/specifika*	*Ta [°C]*	*Dolžina [bp]*
IS900S1[a]	GGGTTGATCTGGACAATGACGGTTA	IS900/MAP	62	572
IS900R3	AGCGCGGCACGGCTCTTGTT			
IS1245-P1[b]	GCCGCCGAAACGATCTAC	IS1245/MAH, MAA	59	427
IS1245-P2	AGGTGGCGTCGAGGAAGAC			
IS901-1[c]	GCAACGGTTGTTGCTTGAAA	IS901/MAA	56	1108
IS901-2	TGATACGGCCGGAATCGCGT			

[a] (Vansnick in sod., 2004)
[b] (Guerrero in sod., 1995)
[c] (Kunze in sod., 1992)

DNK iz vseh kultur smo vedno pomnožili z vsemi pari začetnih oligonukleotidov (v ločenih reakcijah), da smo se prepričali, da ni prišlo do navzkrižne kontaminacije med podvrstami *Mycobacterium avium*.

Prisotnost PCR pomnožka iz posamezne PCR reakcije smo preverili z gelsko elektroforezo v 1,2 % agaroznem gelu.

3.6.2 Pomnoževanje gena za bakterijsko 16S rRNK in restrikcijska analiza

Morebitno kontaminacijo z drugimi bakterijami, ki ne spadajo med podvrste bakterije *M. avium*, smo preverjali z restrikcijsko analizo pomnoženega odseka gena za 16S rRNK. V primeru homogene (nekontaminirane) kulture, dobimo po rezanju pomnoženega odseka gena za 16S rRNK z ustreznim restrikcijskim encimom na gelski elektroforezi specifičen profil odsekov (število in velikost). V primeru prisotnosti drugih bakterij (kontaminacija) so po rezanju prisotni dodatni odseki različnih dolžin kot posledica pomnoževanja različnih genov za 16S rRNK z različno razporeditvijo prepoznavnih mest za restrikcijski encim.

Izolacijo DNK iz kultur smo izvedli z SmartHelix™ EZextract kitom. DNK smo nato pomnožili s klasično PCR z evbakterijskimi začetnimi oligonukleotidi 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) in 1495R (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA). PCR mešanica je vsebovala 5 µl 10×PCR pufra, 3 µl $MgCl_2$ (25 mM), 1 µl dNTP (2,5 mM vsak), po 1 µl vsakega začetnega oligonukleotida (10 µM), 0,3 µl AmpliTaq polimeraze (5 U/µl), 1 µl DNK in deionizirane vode do 50 µl (vsi reagenti od Applied Biosystems, ZDA, razen začetni oligonukleotidi od Jena Bioscience, NEM). Pogoji pomnoževanja: začetna denaturacija 2 min pri 95 °C, 35 ciklov 45 s pri 95 °C, 45 s pri 54 °C, 3 min pri 72 °C, in končno podaljševanje 10 min pri 72 °C.

Za rezanje PCR pomnožka smo izbrali restrikcijski encim *Hha*I, ki je omogočal ločitev restrikcijskega profila podvrst bakterije *M. avium* od ostalih bakterij, kar smo določili s

teoretičnim rezanjem predvidenega pomnožka z gena za 16S rRNK različnih bakterij (zaporedja smo izbrali naključno iz različnih debel bakterij v bazi 16S rRNK zaporedij RDP, http://rdp.cme.msu.edu/) z orodjem Nebcutter V2.0 (http://tools.neb.com/NEBcutter2/). *Hha*I razreže pomnožen odsek gena za 16S rRNK podvrst bakterije *M. avium* na 4 manjše odseke: 411, 408, 368 in 312 bp.

Reakcijska mešanica za restrikcijsko reakcijo je vsebovala 3 µl 10×Tango pufra, 2 µl encima *Hha*I (oboje od Fermentas, Thermo Scientific, ZDA), 15 µl PCR pomnožka in deionizirane vode do 30 µl. Mešanico smo inkubirali 16 ur na 37 °C, nato pa reakcijo ustavili z dodatkom 1,3 µl EDTA (0,5 M, pH 8). Produkte restrikcijske reakcije smo očistili čez silikatne kolone z uporabo Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA) z elucijo v 20 µl deionizirane vode.

Produkte restrikcijske reakcije smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo (2%) in barvanjem s SybrGreen I (Sigma-Aldrich, ZDA).

3.6.3 Pomnoževanje gena za 18S rRNK ameb

Odsek na genu za 18S rRNK smo pomnoževali z dvema paroma univerzalnih začetnih oligonukleotidov (Preglednica 7). Reakcijska mešanice je vsebovala 5 µl reakcijskega pufra, 3 µl $MgCl_2$ (25 mM), 2 µl dNTP (2,5 mM vsak), 1 µl vsakega začetnega oligonukleotida (10 µM), 0,3 µl Amplitaq DNA polimeraze 5 U/ µl (vse od Applied Biosystems, Life Technologies, ZDA), 2 µl DNK in deionizirane vode do 50 µl. Za pomnoževanje smo uporabili program: 2 min začetne denaturacije pri 95 °C, 35 ciklov denaturacije 45 s pri 95 °C, pripenjanja 45 s pri 55 °C (Ambz19F/Ambz580R) ali 59° (EukA/EukB) in podaljševanja 45 s (Ambz19F/Ambz580R) ali 90 s (EukA/EukB) pri 72 °C ter zaključnega podaljševanja 5 min pri 72 °C.

Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje odseka gena za 18S rRNK
Table 7: Primers for amplification of gene for 18S rRNK

Oznaka ZO	*Zaporedje 5'→3'*	*Tarča/specifika*	*Ta [°C]*	*Dolžina [bp]*
Ambz19F[a]	TGGTTGATCCTGCCAGTAGT	univerzalni 18S amebe	55	~ 560
Ambz580R	CGCCTGCTGCCTTCCTT			
EukA[b]	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	univerzalni 18S evkarionti	59	~ 1800
EukB	TGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC			

Prisotnost in velikost pomnoženih odsekov smo preverili z agarozno elektroforezo. Odsekom smo določili nukleotidno zaporedje (Macrogen, Nizozemska) in njihovo identiteto preverili v Genebank bazi nukleotidnih zaporedij z algoritmom BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). V primeru, da smo na kromatogramu dobili homogeno zaporedje, smo sklepali, da je populacija ameb na izvorni NNA plošči monoklonalna.

3.6.4 PCR na osnovi bakterijske kolonije

Za preverjanje insertov v plazmidih smo izvedli PCR neposredno iz kolonij transformant Po eno kolonijo transformante smo z zobotrebcem prenesli v PCR mešanico, ki je vsebovala 5 µl 10×PCR pufra, 3 µl $MgCl_2$ (25 mM), 1 µl dNTP- jev (10 mM vsak) (vse od

Fermentas, Thermo Scientific, ZDA), 1 µl vsakega začetnega oligonukleotida (10 µM, M13F 5'-GTAAAACGACGGCCAG in M13R 5'-CAGGAAACAGCTATGAC), s specifiko levo in desno od mesta inserta na klonirnem vektorju pCR2.1 (Invitrogen, Life Technologies, ZDA), 0,3 µl Taq polimeraze (Fermentas) in deionizirane vode do 50 µl. Program je vključeval začetno denaturacijo (in lizo *E. coli* transformant) 5 min pri 92 °C, 35 ciklov denaturacije 45 s pri 95 °C, pripenjanja 45 s pri 46 °C, podaljševanja 30 s pri 68 °C in zaključno podaljševanje 5 min pri 72 °C.

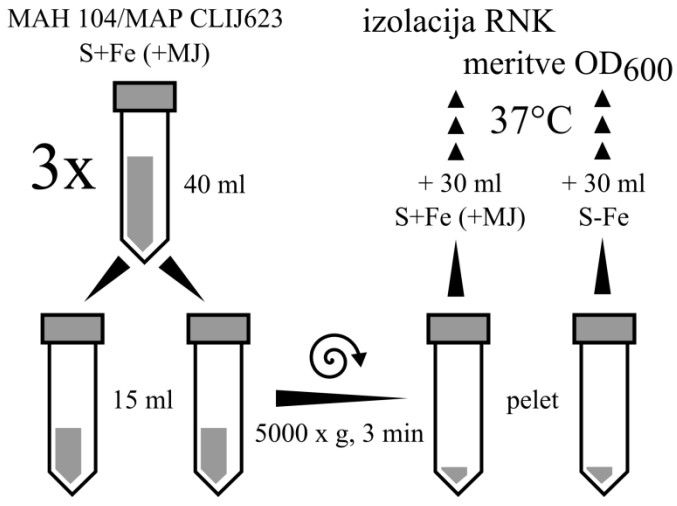
Dolžino PCR pomnožkov smo preverili z gelsko elektroforezo v 1,5% agaroznem gelu. PCR pomnožke smo v tem primeru barvali s Sybrgreen po končani elektroforezi (1 µl 10.000× koncentriranega SybrGreen-a v 10 ml 0,5×TBE pufra, inkubacija 15 min pri ST).

3.7 IZOLACIJA RNK ZA ANALIZO IZRAŽANJA *MBT* OPERONOV

3.7.1 Eksperimentalni pogoji

Za analizo in primerjavo izražanja mbt operonov smo uporabljali kulture MAP CLIJ623 in MAH 104, v preliminarnih poskusih MAP 468/09. Kulture smo vzdrževali na Herrold's egg yolk poševnikih (Beckton Dickinson, ZDA) z (MAP) ali brez (MAH) dodanega mikobaktina J. Po eno kolonijo vsakega seva smo precepili v 30 ml tekočega modificiranega Sauton's gojišča z železom v triplikatih.

Ko so kulture dosegle optično gostoto pri 600 nm (OD_{600}) od 0,4 do 0,5, smo 15 ml kulture prenesli v dve sterilni 50-ml centrifugirki. Kulture smo centrifugirali 3 min pri 5.000×g in gojišče previdno odlili. V eno centrifugirko smo dodali 30 ml svežega Sauton's gojišča z železom (S+Fe) (in mikobaktinom J (2 mg/l) v primeru MAP), v drugo pa 30 ml svežega Sauton's gojišča brez dodanega železa (S-Fe). Resuspendirane kulture smo revitalizirali 30 min na 37 °C, nato pa zajeli prvi vzorec (čas 0) za RNK izolacijo.



Slika 12: Shema priprave kultur za analizo izražanja *mbt* operonov
Figure 12: Preparation of cultures for the analysis of *mbt* operon expression

Rast kultur smo redno spremljali z merjenjem OD_{600} in RNK izolirali v i) začetni (lag) fazi, ii) zgodnji eksponentni fazi in iii) v stacionarni fazi.

V preliminarnih poskusih z MAH 104 in MAP 468/09 smo RNK izolirali samo ob času 0 (30 min po menjavi gojišč) in po 24 urah. Poskus smo izvedli brez ponovitev in brez kontrole v gojišču z železom, saj smo želeli v prvi fazi samo preveriti izražanje in ravni posameznih genov *mbt* operonov.

3.7.2 Izolacija RNK

Izolacijo RNK smo izvedli po modificiranem protokolu Chomczynskega (Chomczynski in Sacchi, 2006)Vsi reagenti so bili pripravljeni z deionizirano vodo, obdelano z dietil pirokarbonatom (DEPC-voda; 0.2 ml DEPC/100 ml vode, inaktivacija DEPC z avtoklaviranjem) za inaktivacijo morebitno prisotnih RNaz. Vsa uporabljena potrošna plastika je bila certificirana brez RNazne aktivnosti. Vse delovne površine so bile pred začetkom temeljito očiščene z etanolom in RNase ZAP raztopino (Ambion, Life Technologies, ZDA). V lag fazi smo za izolacijo RNK vzeli po 1 ml, v zgodnji eksponentni fazi 0,5 ml in v stacionarni fazi 0,1 ml kulture. Nadaljnji protokol je natančno opisan kot sledi:

1. Kulturo smo centrifugirali 5 min pri 10.000×g pri sobni temperaturi (ST) v 2-ml epicah z navojem;
2. Odpipetirali gojišče in pelet resuspendirali v 500 µl denaturacijske raztopine (4 M gvanidinijev izotiocianat, 25 mM natrijev citrat, pH 7,0, 0,5% (w/v) N-lauroilsarkozin, 0,7% (v/v) 2-merkaptoetanol (dodali tik pred uporabo));
3. Suspenziji smo dodali 375 mg steklenih kroglic (premer < 106 µm, Sigma-Aldrich, ZDA) in stresali 2 min v stresalniku (*ang.* bead beater) Mill Mix 20 (Tehtnica, Slovenija) na 30 Hz;
4. Dodali smo 50 µl 2 M natrijevega acetata (pH 4,0), dobro premešali na vorteksu, dodali še 500 µl fenol/kloroform/izoamil alkohola (25:24:1, pH 4-5, Roth, Nemčija) in ponovno premešali na vorteksu;
5. Mešanico smo še enkrat stresali 2 min pri 30 Hz, nato ohladili vzorce na ledu 15 min;
6. Centrifugirali 20 min pri 16.000×g pri 4 °C in prenesli vodno fazo v nove sterilne epice, certificirane brez RNaz;
7. RNK smo oborili z dodatkom 500 µl izopropanola in inkubirali vzorce najmanj 1 h na -20 °C;
8. Centrifugirali 20 min pri 16.000×g pri 4 °C in odlili supernatant;
9. Precipitacijo RNK smo ponovili, tako da smo jo najprej raztopili v 300 µl denaturacijske raztopine (za sestavo glej točko 2) in nato dodali 300 µl izopropanola in inkubirali vzorce 30 min pri -20 °C;
10. Centrifugirali 15 min pri 16.000×g pri 4 °C, odlili supernatant;
11. Pelet smo sprali z dodatkom 1 ml 75% etanola, vorteksirali in inkubirali 5-10 min na ST;
12. Centrifugirali 20 min pri 16.000×g pri 4 °C, odlili supernatant, preostanke previdno popivnali s papirnato brisačko;
13. Pelet smo sušili ob namiznem gorilniku 5-10 min, nato pa ga raztopili v 40 µl DEPC-vode;
14. Vzorce smo shranili pri -80 °C;

Koncentracijo in čistost RNK smo določili spektrometrično z merjenjem absorpcije pri 260 in 280 nm v 2 µl kapljicah vzorca na Take3 ploščici, s čitalcem plošč SynergyH4 (Biotek, ZDA).

3.8 PRIPRAVA cDNK

3.8.1 Odstranjevanje genomske DNK

Izolacija čiste RNK, brez DNK, je praktično nemogoča. Zato smo vzorce obdelali z DNazo I, da se znebimo morebitno prisotne DNK, ki bi motila kasnejšo kvantifikacijo mRNK z real-time PCR. DNazna mešanica je vsebovala 10 µl RNK, 1 µl RNaz-nega inhibitorja (20 U/µl Applied Biosystems, Life Technologies, ZDA), 2 µl 10× DNaznega pufra in 3-5 µl Dnaze I (1 U/µl) (oboje od Fermentas, Thermo Scientific, ZDA), in DEPC-vodo do 20 µl. Mešanico smo inkubirali 90 min pri 37 °C, nato pa inaktivirali encim z dodatkom 2 µl 50 mM EDTA in inkubacijo 10 min pri 65 °C.

3.8.2 Reverzna transkripcija

Očiščeno RNK smo nato prepisali v cDNK z reverzno transkripcijo. Uporabili smo komplet reagentov High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, ZDA). Mešanica je vsebovala 10 µl očiščene RNK, 2 µl 10× pufra, 2 µl 10× naključnih začetnih oligonukleotidov, 0,8 µl 100 mM dNTP-jev, 1 µl RNaz-nega inhibitorja (20 U/µl) in 1 µl Multiscribe reverzne transkriptaze (50 U/µl) in DEPC vode do 20 µl. Mešanico smo inkubirali 10 min na 25 °C, 120 min pri 37 °C in 5 min pri 85 °C, tako pripravljeno cDNK smo shranili pri -80 °C.

3.9 KVANTITATIVNI REAL-TIME PCR

3.9.1 Začetni oligonukleotidi

Začetne oligonukleotide (Preglednica 3.9.1) za posamezne gene *mbt* operonov in druge gene smo oblikovali s programom PrimerExpress (Applied Biosystems, Life Technologies, ZDA) na podlagi javno dostopnih nukleotidnih zaporedij genomov *Mycobacterium avium* 104 (MAV 104, Genebank ID:118462219) in *Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis* K-10 (MAP K-10, Genebank ID: 41406098). Izbrali smo oligonukleotide, ki so nalegali na posamezne gene obeh bakterij. V ožji izbor smo uvrstili pare začetnih oligonukleotidov, ki so tvorili najmanj sekundarnih struktur, kar smo preverili s prosto dostopnim programom NetPrimer (Premier Biosoft, ZDA, http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch). Specifiko naleganja vseh nukleotidov smo preverili z javno dostopnim algoritmom BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Preglednica 8: Začetni oligonukleotidi za gene *mbt* operonov in drugih genov

Table 8: Primers for genes of *mbt* operons and other genes

Oznaka ZO	*Zaporedje (5'→3')*	*Ime gena*	*Oznaka gena MAV104/ MAP K-10*	*Ta [°C]*	*Velikost pomnožka PCR [bp]*
Geni mbt operonov					
mbtA5_f	CACCACCGGCACACCAA	*mbtA*	MAV_2008/MAP2178	60	59
mbtA5_r	TGGCGTTGAAGACGTAATCGT				
mbtB1F	CCGAAGGGTGTCGAAGTCA	*mbtB*	MAV_2009/MAP2177c	62	136
mbtB1R	ACACGTCCATCACCGAGATGT				
mbtC1F	CGAGCACAGCGGTCATCTACT	*mbtC*	MAV_2011/MAP2175c	60	109
mbtC1R	GCACGAGGAGTCCACAGTCA				
mbtD2F	CGACTACGCCAGCTACTGGTATG	*mbtD*	MAV_2012/MAP2174c	60	66
mbtD2R	CACTGCACAGCCAGATCGAA				
mbtE1F	GCTCAACATCTGCGTTTCCTATC	*mbtE*	MAV_2013/MAP2173	60	274
mbtE1R	CGAATCCTTGCTCAGGTCGAA				
mbtG1F	GCTGCAAGAGGCGATAGGTT	*mbtG*	MAV_2015/MAP2170c	60	82
mbtG1R	GGTGAGCCCGGACAGGTT				
mbtI1F	CCGTTGTCTCCAAGTGCCTT	*mbtI*	MAV_1792/MAP2205c	60	99
mbtI1R	CCAAGCCGCAGCAGAAAC				
mbtJ3F	TGCCCGAACAGATGGTGAT	*mbtJ*	MAV_1798/MAP2197	60	74
mbtJ3R	CCCGGTTGCAGCAGTAGGT				
mbtK2_f	AGCTACTCGCTGCCGTTGAT	*mbtK*	MAV_2875/MAP1552	60	128
mbtK1R	GCGTGCAGTCCCAGATCGTA				
mbtN1F	TCGCCGATCACATCATGGT	*mbtN*	MAV_2876/MAP1553c	60	121
mbtN2_r	TCCTTGGCATAGGGTCGCT				
mbtM1F	TGGGCGGAATGTCGTTGT	*mbtM*	MAV_2874/MAP1554c	60	198
mbtM1R	GCTCCCCGCCGTTGAT				
mbtL2F	TCACCCGAAAACCACGTCA	*mbtL*	MAV_2873/MAP1555c	60	126
mbtL2R	GAACGCCACCGAGTCCAG				
mbtAa1f	CGTGCTCCGGCAATGG	/	MAV_2010/MAP2176c	60	91
mbtAa1r	TTCGACGTGGTCGTAGAGGTAGA				
Drugi geni					
ideR1F	TGTATCTGCGGACCATCTACGA	*ideR*	MAV_3604/MAP2827	60	92
ideR1R	GGTCGGCCCGCTCTGAT				
bfrA1F	AGTTTTGCGTCTGCTCAACGA	*bfrA*	MAV2833/MAP1595	60	74
bfrA1B	GGAGTGCAGGAAGTATTGGTTGA				
sigA2_f	GGCAGCGAC**T**CAAAGCAAG	*sigA*	MAV_3595MAP2820	60	54
sigA2_r	TGTGGCGGTGCGTTTCAC				

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 8: Začetni oligonukleotidi za gene *mbt* operonov in drugih genov

Oznaka ZO	*Zaporedje (5'→3')*	*Ime gena*	*Oznaka gena MAV104/ MAP K-10*	[a] T_a [°C]	*Velikost pomnožka PCR [bp]*
Drugi geni					
ideR1F	TGTATCTGCGGACCATCTACGA	*ideR*	MAV_3604/MAP2827	60	92
ideR1R	GGTCGGCCCGCTCTGAT				
bfrA1F	AGTTTTGCGTCTGCTCAACGA	*bfrA*	MAV2833/MAP1595	60	74
bfrA1B	GGAGTGCAGGAAGTATTGGTTGAT				
sigA2_f	GGCAGCGACCAAAGCAAG	*sigA*	MAV_3595MAP2820	60	54
sigA2_r	TGTGGCGGTGCGTTTCAC				
secA_F	GGCCTGCTCCTTGAGGTT	*secA*	MAV_4203/MAP3354c	60	64
secA_R	GCGCAAGGTGATCTACGC				
entC_F	GCGCTCCCAAGAAGTGTCAA	*entC*	MAV4163/MAP3316	60	97
entC_R	GTCGCTGACGCTCACGGTAT				
irtA_F	GCATCCACGTCCTCGAAGAG	*irtA*	MAV1566/MAP2414c	60	133
irtA_R	GCCTCCAGGGTGTGATGCT				
viuB_F	GCCAGTAGCCCGAGATCGA	*viuB*	MAV3748/MAP2960c	60	89
viuB_R	CCAAGCCGTCATGCACAAC				
1559c_R	GCAGCACGGTCATGATCGT	/	MAV2869/MAP1559c	60	73
1559c_F	ACCGTTCGCCAGGTCCAT				
esxG_F	GCTCACATTCCGCAGTTGGT	*esxG*	MAV4866/MAP3783	60	102
esxG_R	GGCCGAGACCGCTTCCT				

[a] temperatura pripenjanja, uporabljena pri pomnoževanju gena z real-time PCR

Za kvantifikacijo IS*900* in detekcijo IS*1245* smo uporabili začetne nukleotide iz literature (Preglednica 9).

Preglednica 9: Začetni oligonukleotidi za kvantifikacijo IS*900* in IS*1245*
Table 9: Primers for quantification of IS*900* and detection of IS*1245*

Oznaka ZO	*Zaporedje 5' → 3'*	*Tarča/specifika*	[c] T_a [°C]	[d] [bp]
[a]DH2F	GCCTTCGACTACAACAAGAGC	IS*900*/MAP	60	65
DH2R	GCGTCGGGAGTTTGGTAG			
DH2P	FAM - GCCGCGCTGATCCTGCTTACT - TAMRA			
[b]IS1245F	CCGGATCTGCAAAGACCTC	IS*1245*/MAA in MAH	60	130
IS1245R	CGACACCACCCGATGATTC			
IS1245TM	FAM-CGGTTGGGTGATCAGCGCTTTC-TAMRA			

[a] (Herthnek in Bolske, 2006); [b] (Slana in sod., 2010); [c] uporabljena temperatura pripenjanja začetnega oligonukleotida v Real-time PCR; [d] velikost PCR pomnožka

3.9.2 Priprava kvantifikacijskih standardov

3.9.2.1 Pomnoževanje s PCR in kloniranje

Odseke posameznih genov *mbt* operonov in drugih genov, ki smo jih nameravali kvantificirati, smo najprej pomnožili s klasično PCR z istimi začetnimi nukleotidi, ki smo jih kasneje uporabljali za kvantifikacijo. Reakcijska mešanica je vsebovala 5 µl reakcijskega pufra, 3 µl $MgCl_2$ (25 mM), 2 µl dNTP (2,5 mM vsak), 1 µl vsakega začetnega oligonukleotida (10 µM), 0.3 µl Amplitaq DNA polimeraze (5 U/µl) (vse od Applied Biosystems, Life Technologies, ZDA), 1 µl DNK MAP 468/09 in deionizirane vode do 50 µl. Za pomnoževanje smo uporabili program: 2 min začetne denaturacije pri 95 °C, 35 ciklov denaturacije 45 s pri 95 °C, pripenjanja 30 s pri 57 °C in podaljševanja 30 s pri 72 °C ter zaključnega podaljševanja 5 min pri 72 °C. PCR pomnožke smo preverili z agarozno (2 %) gelsko elektroforezo. PCR smo po potrebi optimizirali s spreminjanjem temperature prileganja začetnih nukleotidov. Pomnožene odseke smo očistili iz agaroznega gela z Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA) in jih sklonirali s kompletom TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Life Technologies, ZDA). Klonirna mešanica je vsebovala 0,5 µl PCR pomnožka, 1 µl 4-krat redčene raztopine soli (1,2 M NaCl, 0,06 M $MgCl_2$), 0,5 µl klonirnega vektorja pCR2.1 (Invitrogen, Life Technologies, ZDA) in 3,5 µl sterilne deionizirane vode. Ligirani vektor smo z elektroporacijo transformirali v elektrokompetentne *E. coli* po navodilih proizvajalca klonirnega kita. Po pet transformant smo analizirali za prisotnost pravilnega inserta s PCR na osnovi kolonije. Iz pozitivnih klonov smo z alkalno lizo izolirali plazmidno DNK in jo uporabili kot kvantifikacijski standard v Real-time PCR. Vsem uporabljenim kvantifikacijskim standardom smo določili nukleotidno zaporedje (Macrogen, Nizozemska), da smo potrdili prisotnost pravilnega inserta.

Plazmide, ki so vsebovali željene inserte, smo shranili pri -20 °C, izvorne transformante smo shranili v Microbank vialah (Pro-Lab Diagnostics, Kanada) pri -80 °C.

3.9.2.2 Določevanje koncentracije kvantifikacijskih standardov

Izolacija plazmidov z alkalno lizo lahko sprosti iz celic tudi del kromosomske DNK. To bi lahko vodilo k napačni oceni števila plazmidov v ekstraktu, če bi se zanašali zgolj na meritve celokupne DNK. Zato smo koncentracijo plazmidov, ki smo jih uporabili kot kvantifikacijske standarde, določili z real-time PCR.

Za kvantifikacijski standard smo v tem primeru vzeli čist vektor pCR2.1 (čistost garantira proizvajalec – Invitrogen, Life Technologies, ZDA) in mu pomerili koncentracijo DNK s Qubit fluorometrom po navodilih proizvajalca (Invitrogen, Life Technologies, ZDA). Absolutno kvantifikacijo smo izvedli z Real-time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, ZDA). Pripravili smo si 6 zaporednih 10-kratnih redčitev vektorja pCR2.1, ki so služile za umeritveno krivuljo (triplikati). Pomnoževali smo z začetnimi oligonukleotidi, ki so nalegali na vektor pCR2.1 izven klonirnega mesta (mesto, ki je enako pri plazmidih z in brez inserta), pCR21f 5'-TGCCTGCTTGCCGAATATC in pCR21r 5'-CCACAGTCGATGAATCCAGAAA. Vsak plazmid (za vsak insert) smo kvantificirali v dveh redčitvah (100- in 1000-kratna) v duplikatih. PCR mešanica je vsebovala 10 µl 2×Power SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, ZDA, 0,8 µl vsakega začetnega oligonukleotida, 7,4 µl deionizirane vode in

1 µl posamezne redčitve plazmidov. Program pomnoževanja je bil: 2 min pri 50 °C, 10 min pri 95 °C, 40 ciklov denaturacije 15 s pri 95 °C, pripenjanja in pomnoževanja 1 min pri 60 °C, z vključeno disociacijsko krivuljo po privzetih nastavitvah. Koncentracije plazmidov z inserti smo določili iz umeritvene krivulje redčitev čistega vektorja pCR21. Redčitve plazmidov, ki smo jim določili koncentracijo, smo alikvotirali in shranili pri –20 °C.

3.9.3 Kvantifikacija IS*900* in detekcija IS*1245*

3.9.3.1 Izvedba kvantifikacije

V vseh okoljskih vzorcih smo izvedli detekcijo in kvantifikacijo IS*900* (specifično za MAP) in le detekcijo v primeru IS*1245* (specifično za MAA in MAH) z Real-time PCR.
Kvantifikacijo smo izvedli na Real-time PCR system 7500 (Applied Biosystems, Life Technologies, ZDA) na ploščah 96-formata. Vsak vzorec smo kvantificirali pri dveh redčitvah (vsako redčitev v duplikatu), da smo spremljali morebitno inhibicijo PCR, ki izvira iz matriksa okoljskega vzorca. Vzorce, ki so kazali inhibicijo, smo dodatno redčili, dokler razlika v Ct (treshold cycle) vrednostih med redčitvami ni ustrezala teoretični (faktor redčitve = $2^{\Delta Ct}$). Na isto 96-format ploščo smo vsakič nanesli tudi redčitveno vrsto kvantifikacijskega standarda (6 zaporednih 10-kratnih redčitev v triplikatih) za pripravo umeritvene krivulje. PCR mešanica je vsebovala 10 µl TaqMan Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems, Life Technologies, ZDA), 0,75 µl vsakega začetnega oligonukleotida (10 µM), 0,5 µl sonde (10 µM) in 1 µl DNK vzorca. Program pomnoževanja je bil: 2 min pri 50 °C, 10 min pri 95 °C, 45 ciklov denaturacije 15 s pri 95 °C, pripenjanja in pomnoževanja 1 min pri 60 °C.
Koncentracijo DNK v vzorcu (ρ) smo določili iz umeritvene krivulje in preračunali na število MAP celic na volumsko ali masno enoto vzorca (C_{MAP}):

$$C_{MAP} = \frac{N_A \cdot \rho \cdot x \cdot V_i}{M \cdot Y \cdot 15} \qquad ...(3)$$

kjer je N_A Avogadrovo število ($6{,}022 \times 10^{23}$), ρ masna koncentracija DNK v vzorcu, x faktor redčitve vzorca, V_i volumen ekstrakta DNK, Y izhodni volumen oziroma masa vzorca za analizo in M molekulska masa kvantifikacijskega standarda. M je seštevek baznih parov vektorja in inserta, pomnoženo s povprečno molekulsko maso baznega para (650 g/mol). Število 15 v imenovalcu predstavlja povprečno število kopij IS*900* na genom MAP (Bull in sod., 2000).

Prisotnost IS*1245* v posameznem vzorcu smo potrdili, če smo do 45. cikla opazili pomnoževanje v obeh replikatih v vsaj eni izmed redčitev na plošči, pod pogojem, da v negativni kontroli pomnoževanja nismo zaznali.

Po 30 naključnih PCR pomnožkov iz pozitivnih vzorcev smo sekvenirali (Macrogen, Korea), da bi se prepričali o specifiki pomnoževanja IS*900* in IS*1245* z uporabljenimi začetnimi oligonukleotidi in sondami. Za te namene smo pomnožke IS*900* prečistili z Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA) in vsakega posamezno sklonirali s TOPO TA Cloning Kit-om (Invitrogen, Life Technologies, ZDA) kot opisano pod točko 3.9.2.1 in določili nukleotidno zaporedje (Macrogen, Nizozemska). Pomnožke IS*1245* pred sekveniranjem nismo sklonirali, temveč smo jim zaporedje določili neposredno. Za razliko v pripravi vzorcev za sekveniranje smo se odločili zaradi precej

krajšega pomnoženega odseka v primeru IS900 (65 bp), ki bi onemogočal določitev zaporedja neposredno iz pomnožka. Pomnožek IS1245 je daljši (130 bp), zaradi česar po neposrednem sekveniranju lahko dobimo dovolj dolgo zaporedje za iskanje podobnosti v bazah nukleotidnih zaporedij.

3.9.3.2 Statistična obdelava

Za statistično analizo distribucije vzorcev po različnih kategorijah smo uporabljali dvosmerni Studentov *t*-test. Za analizo povezave med IS*900* in IS*1245* pozitivnimi vzorci smo uporabili hi-kvadrat test (χ^2) ter razmere obetov s 95% intervalom zaupanja. Vse izračune, razen Studentovega *t*-testa (računali v Microsoft Excell), smo opravili na spletni strani za statistično računanje Vassarstats (http://vassarstats.net/).

3.9.4 Kvantifikacija izražanja genov *mbt* operonov in drugih genov

3.9.4.1 Izvedba kvantifikacije

Kvantifikacijo mRNA transkriptov smo izvedli na Real-time PCR System 7500 v 96-format ploščah (Applied Biosytems, Life Technologies, ZDA). Vsak vzorec cDNK smo kvantificirali v dveh redčitvah (5- in 25-kratna), v duplikatih, za vsak gen, katerega izražanje smo merili. Na isto ploščo smo vsakič nanesli tudi 6 zaporednih 10-kratnih redčitev kvantifikacijskega standarda v triplikatih. Kontrolo DNK kontaminacije smo preverili le v primeru kvantifikacije *mbtA* transkriptov, saj smo v preliminarnih poskusih ugotovili, da je izmed vseh genov *mbt* operonov, transkriptov *mbtA* najmanj, zaradi česar lahko pri tem genu pričakujemo največjo napako pri kvantifikaciji transkriptov ob morebitni kontaminaciji z genomsko DNK.

PCR mešanica je vsebovala 10 µl 2×Power SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, ZDA, 0,8 µl vsakega začetnega oligonukleotida, 6,4 µl deionizirane vode in 2 µl posamezne redčitve cDNK (enako za kvantifikacijske standarde). V vsako jamico smo dodali tudi cca 15 µl (2 kapljici) qPCR Booster™ reagenta (Sekvenator d.o.o., Slovenija) za boljšo koherentnost fluorescentnih signalov v replikatih. Program pomnoževanja je bil: 2 min pri 50 °C, 10 min pri 95 °C, 45 ciklov denaturacije 15 s pri 95 °C, pripenjanja in pomnoževanja 1 min pri 60-62 °C (odvisno od para začetnih nukleotidov, glej Tabelo 3.9.1), z vključeno disociacijsko krivuljo po privzetih nastavitvah. Koncentracije mRNK transkriptov smo določili iz umeritvene krivulje kvantifikacijskega standarda. Masno koncentracijo (ρ) smo pretvorili v absolutno število transkriptov posameznega gena (N) po enačbi

$$N = \frac{N_A \cdot \rho \cdot x \cdot V_i}{M} \qquad ...(4)$$

kjer je N_A Avogadrovo število ($6{,}022\times10^{23}$), ρ masna koncentracija DNK v vzorcu, x faktor redčitve vzorca, V_i volumen ekstrakta RNK in M molekulska masa kvantifikacijskega standarda. M je seštevek baznih parov vektorja in inserta, pomnoženo s povprečno molekulsko maso baznega para (650 g/mol).

Absolutne vrednosti transkriptov posameznih genov *mbt* operonov smo normirali na transkripcijo »housekeeping« gena *sigA* (Schnappinger in sod., 2003) in *secA* (Janagama in sod., 2010a) in primerjali izražanje posameznih genov v pogojih rasti z (S+Fe, [Fe] = 100 μM) in brez železa (S-Fe, [Fe] < 0,5 μM) pri obeh mikobakterijah, v dveh neodvisnih poskusih.

3.9.4.2 Statistična obdelava

Za statistično vrednotenje razlik v povprečjih podatkovnih parov smo uporabili Studentov *t*-test. Korelacije v izražanju med posameznimi geni smo izračunali z rangiranjem normiranih vrednosti izražanja posameznega gena po velikosti in izračunom Spearmanovega korelacijskega koeficienta ρ. Spearmanov korelacijski koeficient za razliko od Pearsonovega ne meri linearne povezanosti številskih spremenljivk, temveč le monotonost povezave. To nam je omogočilo zanemariti absolutne razlike v spremembah izražanja med posameznimi geni in določiti le korelacije v trendu izražanja. Kritične vrednosti ρ za različne vejetnosti α smo odčitali iz statističnih tablic. Za izračun 95% intervala zaupanja korelacijskih koeficientov smo Spearmanove koeficiente najprej pretvorili s Fisherjevo transformacijo v normalno porazdelitev

$$z = \frac{1}{2}\ln\left(\frac{1+\rho}{1-\rho}\right) \qquad ...(5)$$

kjer je *z* Fisherjev koeficient, *ln* naravni logaritem in ρ Spearmanov korelacijski koeficient. Zgornjo (x_1) in spodnjo (x_2) mejo 95% intervala zaupanja za Fisherjev koeficient smo izračunali kot

$$x_1 = z + 1{,}96 \cdot \left(\frac{1}{\sqrt{N-3}}\right) \qquad ...(6)$$

in

$$x_2 = z - 1{,}96 \cdot \left(\frac{1}{\sqrt{N-3}}\right) \qquad ...(7)$$

kjer je *z* Fisherjev koeficient, število *1,96* je kritična vrednost Fisherjevega koeficienta *z* za normalno porazdelitev pri α=0,05, izraz v oklepaju pa standardna napaka normalne porazdelitve, pri čemer je *N* število podatkov/meritev. Dobljene intervale normalne porazdelitve smo nato pretvorili nazaj v 95 % intervale zaupanja za Spearmanov koeficient

$$y_1 = \frac{e^{x_1}-1}{e^{x_1}+1} \qquad ...(8)$$

in

$$y_2 = \frac{e^{x_2}-1}{e^{x_2}+1} \qquad ...(9)$$

kjer sta y_1 in y_2 zgornji in spodnji 95 % interval zaupanja za Spearmanov koeficient.

3.10 *IN SILICO* METODE PRIMERJALNE GENOMIKE

Izvedli smo primerjavo nukleotidnih zaporedij celotnih *mbt* operonov, promotorskih regij *mbt* operonov in *bfrA* operona ter IdeR genov med različnimi podvrstami *M. avium* in različnimi tipi MAP.

Za primerjavo celotnih *mbt* operonov smo uporabili prosto dostopna nukleotidna zaporedja genomov *M. avium paratuberculosis,* sev K-10 in S397 (dostopen v obliki sosesk, *ang.* contig), *M. avium* 104 (*ssp. hominissuis*) in *M. avium* ATCC 25291 (*ssp. avium,* dostopen v obliki sosesk). Dodatna zaporedja genomov *M. avium* ssp. *paratuberculosis* nam je podarila organizacija CSIRO (Avstralija), bodisi kot sestavljene soseske (CLIJ361) ali kot seznam polimorfizmov (Pt139, CLIJ623, CLIJ644) s pozicijami relativno na genom MAP k-10.

Genome, ki so bili dostopni v obliki sosesk, smo najprej uvozili v programsko okolje Bioedit (http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html, Ibis Biosciences, ZDA) in manualno poiskali soseske, ki so vsebovale *mbt* operone, z uporabo iskalnega niza nukleotidnih zaporedij iz MAP k-10. Genome, ki so bili v obliki seznama polimorfizmov, smo najprej poravnali z genomom MAP k-10 v programskem okolju Artemis (Rutherford in sod., 2000) (http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/), nato pa zaradi majhnih razlik med genomi, locirane polimorfizme manualno (ločeno za vsak sev) vnesli na ustrezna mesta v zaporedje *mbt* operonov MAP k-10 v programskem okolju Bioedit. Vsa zaporedja *mbt* operonov smo nato uvozili v programsko okolje Vector NTI (Invitrogen, Life Technologies, ZDA), kjer smo določili vezavna mesta za regulator IdeR (iskalni niz TTAGGTTAGGCTAACCTAA (Gold in sod., 2001), prag tolerance neujemanja: 70 %) in odprte bralne okvirje (start kodon: ATG/GTG; stop kodon: TAA/TAG/TGA; min. dolžina ORF: nad 30 kodonov). Homologe genov *mbt* operonov pri različnih podvrstah bakterije *M. avium* smo poiskali z iskanjem podobnosti med teoretičnimi prevedenimi ORF z algoritmom BLAST v bazi proteinskih zaporedij Uniprot (www.uniprot.org) ali z iskanjem homolognih nukleotidnih zaporedij v Genebank bazi nukleotidnih zaporedij, prav tako z algoritmom BLAST. Nukleotidna in aminokislinska zaporedja posameznih genov ali celotnih *mbt* operonov smo poravnali z algoritmom ClustalW v programskem okolju Bioedit.

Za primerjavo promotorskih regij z vezavnim mestom za IdeR regulator in zaporedij gena za IdeR smo vključili dodatne seve *M. avium* podvrst, katerih zaporedja genomov so bila v tem času dostopna v bazi Genebank (Preglednica 10). Večina zaporedij je bila dostopna v obliki nukleotidnih sosesk, zato smo željene regije najprej locirali v programskem okolju Bioedit, kot v primeru lociranja *mbt* operonov. Zaporedja smo izolirali in poravnali s ClustalW, poravnave pa uporabili za filogenetske analize promotorskih regij in gena za IdeR smo izdelali drevesa po metodi združevanja sosedov (Neighbor-Joining, NJ) na podlagi modela največjega verjetja (*ang.* Maximum likelihood) s privzetimi parametri v programskem okolju Mega (Tamura in sod., 2007) (http://www.megasoftware.net/).

Preglednica 10: Genomi uporabljeni v primerjalno genomskih analizah
Z odebeljenim tiskom so označeni sevi, pri katerih smo primerjali celotne *mbt* operone.
Table 10: Genomes used for comparative genomic analysis
In bold are strains that were used for comparison of complete *mbt* operons

Vrsta	*Sev*	*Izoliran iz*	*Genebank ID št.*	*Vir*
MAP	Pt164	Človek (Crohn-ova bolezen)	AFPI01000000	Genebank
MAP	Pt154	Človek (Crohn-ova bolezen)	AFPG01000000	Genebank
MAP	**Pt139**	**Človek (Crohn-ova bolezen)**	**AFPC01000000**	CSIRO, AUS
MAP	Pt144	Človek (Crohn-ova bolezen)	AFPD01000000	Genebank
MAP	Pt145	Človek (Crohn-ova bolezen)	AFPE01000000	Genebank
MAP	ATCC 19689	Krava	AGAR01000000	Genebank
MAP	1281	Antilopa	AGAK01000000	Genebank
MAP	**CLIJ361, tip I**	**Ovca**	**AFNS01000000**	CSIRO, AUS
MAP	**CLIJ623**	**Krava**	**AFHX01000000**	CSIRO, AUS
MAP	**CLIJ644**	**Krava**	**AFNR01000000**	CSIRO, AUS
MAP	DT3	Jelen	AGAN01000000	Genebank
MAP	Env210	Prst	AGAO01000000	Genebank
MAP	JQ5	Kamela	AHAZ01000000	Genebank
MAP	JTC1285	Koza	AGAL01000000	Genebank
MAP	**S397, tip III**	**Ovca**	**AFIF01000000**	Genebank
MAP	**k-10**	**Krava**	**NC_002944**	Genebank
MAA	**ATCC 25291**	**kokoš**	**NZ_ACFI01000000**	Genebank
MAA	DT 78	Vodni bivol	AGAP01000000	Genebank
MAH	**104**	**Človek (AIDS)**	**NC_008595**	Genebank

3.11 DOLOČEVANJE ODPORNOSTI NA ANTIBIOTIKE

3.11.1 Predpogojevanje kultur

Uporabljali smo kulturi MAP 468/09 in MAH 104. Obe kulturi smo najprej privadili na delovni medij, tako da smo po eno kolonijo iz Herrold's Egg yolk poševnika (Becton Dickinson, ZDA) precepili v Sauton's gojišče z železom (in mikobaktinom v primeru MAP). Kulture v eksponentni fazi rasti smo nato precepili v sveže Sauton's gojišče z železom (S+Fe) in brez železa (S-Fe), da smo simulirali rast v pogojih normalne (S+Fe) in nizke dostopnosti železa (S-Fe). V preliminarnih poskusih smo ugotovili, da se odpornost na antibiotike pri MAP ni bistveno razlikovala v S-Fe gojišču z ali brez mikobaktina, zato smo v primeru MAP 468/09 gojiščem vedno dodali 2 mg/ml mikobaktina J, da smo zagotovili zadostno rast bakterij.

3.11.2 Priprava bakterijskih suspenzij

Pripravili smo tri bakterijske suspenzije za vsak poskus odpornosti na antibiotike, ločeno za MAH 104 in MAP 468/9. Po 20 ml kulture v S+Fe in S-Fe v eksponentni fazi rasti smo centrifugirali 3 min pri 5.000×g. Pelet iz S+Fe smo resuspendirali v 30 ml svežega S+Fe gojišča za določanje odpornosti pri normalni dostopnosti železa ($[Fe]_+$ pogoji), pelet iz S-

Fe pa v 30 ml svežega S-Fe gojišča, za določanje odpornosti pri nizki dostopnosti železa ($[Fe]_-$ pogoji). Da bi preverili vpliv »akutnega« pomanjkanja železa na odpornost na antibiotike smo pripravili še tretjo suspenzijo, tako da smo 20 ml S+Fe kulture centrifugirali in pelet resuspendirali v 30 ml svežega S-Fe gojišča ($[Fe]_\Delta$ pogoji). Tako pripravljene suspenzije celic smo nadalje redčili s svežim S+Fe ali S-Fe gojiščem do optične gostote 0,01 pri 600 nm. To je ustrezalo koncentraciji celic $1{,}66\times10^6$ cfu/ml, kar smo določili z razmazom zaporednih 10-kratnih redčitev celic na trdna Sauton's gojišča in štetjem CFU.

3.11.3 Antibiotiki

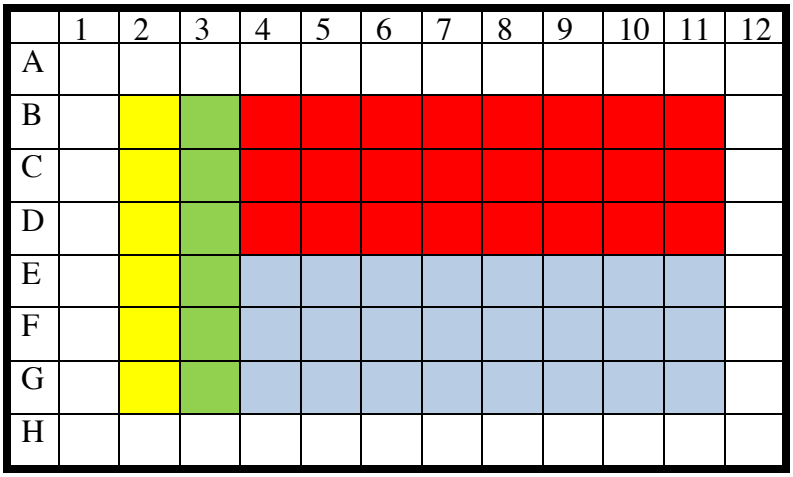
V poskusu smo uporabili naslednje antibiotike/kemikalije: isoniazid (INH), rifampicin (RIF), oksacilin (OXA), streptomicin (STR), 6-merkaptopurin (6-MP), azitromicin (AZM), levofloksacin (LVX), 3-nitropropionska kislina (3-NPA), salicilat (SAL), ampicilin (AMP), ciprofloksacin (CIP) (vsi od Sigma-Aldrich, ZDA) in D-cikloserin (DCS), 4-aminosalicilat (PAS), etambutol (EMB) (vsi od Molekula, VB). Vsak antibiotik/kemikalijo smo raztopili v primernem topilu, sterilno filtrirali in alikvote do uporabe shranili na -20 °C. Svež alikvot je bil uporabljen za vsak eksperiment. Koncentracije antibiotikov v eksperimentu so zajemale območje od subinhibitornih koncentracij do maksimalnih koncentracij v plazmi med zdravljenjem mikobakterioz pri ljudeh.

3.11.4 Resazurinska metoda

Za določanje odpornosti na antibiotike pri MAH 104 in MAP 468/09 smo uporabili resazurinsko metodo (**RE**sazurin **M**icroplate **A**ssay, REMA). Resazurin se zaradi metabolne aktivnosti celic reducira do resorufina, kar opazimo kot prehod iz modre v rožnato barvo ali fluorometrično z ekscitacijo pri 540 nm. Zaradi tega ga lahko uporabimo kot kvalitativni ali kvantitativni indikator bakterijske rasti.

Vse poskuse smo izvajali v belih, sterilnih mikrotitrskih ploščah s 96 jamicami, s prozornim dnom (Greiner Bio-one, NEM). Za vsak antibiotik smo pripravili po tri mikrotitrske plošče, eno za vsako pripravljeno suspenzijo bakterij ($[Fe]_+$, $[Fe]_-$ in $[Fe]_\Delta$ pogoji). Vse zunanje jamice ne plošči smo napolnili z destilirano vodo, da smo preprečili izhlapevanje medija med inkubacijo. Ostale jamice na mikrotitrski plošči smo napolnili s 120 µl posamezne bakterijske suspenzije in dodali 20 µl zaporedne 2-kratne redčitve antibiotika (pripravljene v S-Fe gojišču). Na vsaki plošči je bila tudi negativna kontrola (NCTL, samo gojišče) in pozitivna kontrola rasti (PCTL, bakterije brez antibiotika) in negativna kontrola metode (ACTL, gojišče brez bakterij in posamezna redčitev antibiotika) (Slika 13). Plošče smo pokrili s pokrovom in zatesnili s parafilmom ter inkubirali 96 h (MAH 104) ali 192 h (MAP 468/09) na 37 °C. Nato smo v vse jamice dodali 20 µl resazurina (0,02 %, w/v), inkubirali dodatnih 24 h ter pomerili fluorescenco na čitalcu plošč Synergy H4 (Biotek, ZDA), z ekscitacijo pri 540 nm in merjenjem emisije iz spodnje strani plošče (zaradi kondenza na pokrovu plošče) pri 590 nm. Odpornost na antibiotike smo določali kot odstotek inhibicije rasti pri posamezni koncentraciji antibiotika, definirano kot (1-(fluorescenca vzorca/povprečje PCTL) × 100) in jo izračunali z Gen5 1.10 programsko opremo (Biotek, ZDA). Odpornost smo določali tudi z določanjem minimalnih inhibitornih koncentracij (MIC). Te smo določili vizualno po nadaljnji 4-dnevni inkubaciji pri 37 °C, da smo omogočili popolno spremembo barve resazurina v

jamicah iz modre v rožnato. Najnižjo koncentracijo antibiotika, kjer se barva resazurina ni ali se je le minimalno spremenila, smo določili kot MIC. Za bakteriostatične antibiotike smo za MIC določili najnižjo koncentracijo antibiotika, ki je kazala enako obarvanost kot pri vseh nadaljnjih (višjih) koncentracijah antibiotika. Vsi poskusi odpornosti so bili neodvisno ponovljeni vsaj 3-krat. Statistično pomembnost razlik v odpornosti na antibiotike v različnih pogojih dostopnosti železa smo izračunali z dvosmernim t-testom.

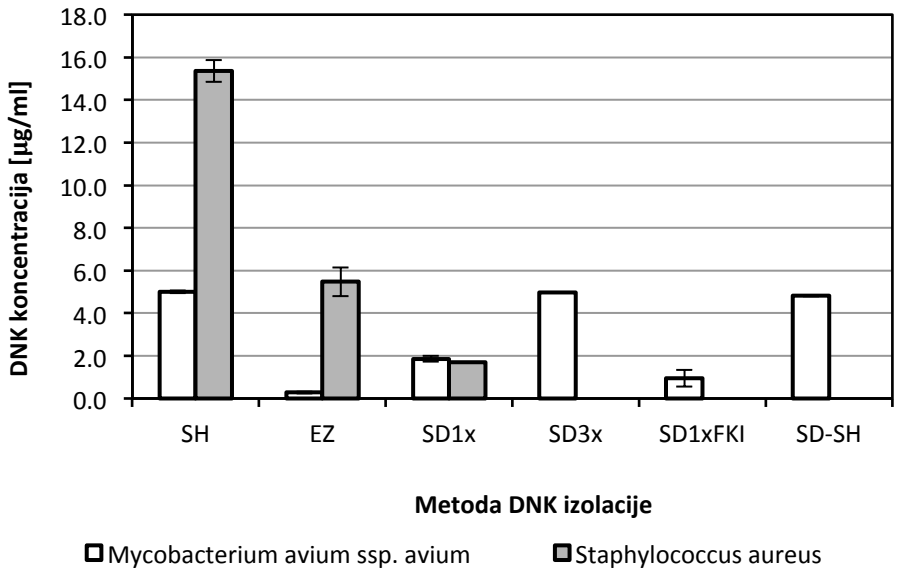


Slika 13: Shema nanosa na mikrotitrsko ploščo za poskus odpornosti mikobakterij na antibiotike
Rumena – NCTL; zelena – PCTL; rdeča – mikobakterije z antibiotikom (zaporedne 2-kratne redčitve antibiotika, od najnižje (levo) do najvišje (desno)), modra – ACTL, bela – dH_2O.
Figure 13: Microtitre plate layout for testing antibiotic susceptibility of mycobacteria
Yellow – NCTL; green – PCTL; red – mycobacterial culutres with antiobiotic (serial 2-fold dilutions of antibiotic, from lowest (left) to highest (right)), blue – ACTL, white – dH_2O.

4 REZULTATI

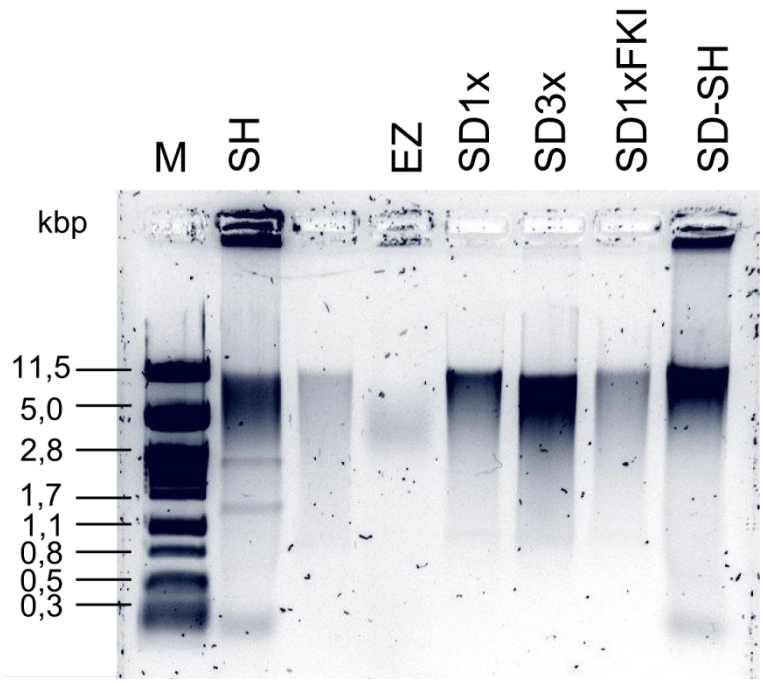
4.1 OPTIMIZACIJA METODE ZA IZOLACIJO DNK IZ MIKOBAKTERIJ

Za izolacijo DNK iz mikobakterij smo preizkusili več obstoječih metod za izolacijo DNK iz mikobakterij. Metodi SmartHelix™ Classic kit in SmartHelix™ DNAid kit, ki smo jih uporabljali za osnovo, sta se predhodno izkazali za učinkoviti pri izolaciji DNK iz različnih kompleksnih matriksov (rezultati niso prikazani). Nadaljnja optimizacija metod je pokazala, da so glede na količino izolirane DNK najbolj učinkovite SH, SD3x in SD-SH, s primerljivo učinkovitostjo (Slika 14). Najmanj DNK smo izolirali z metodo EZ, ki temelji na termalni lizi celic, medtem ko ostale metode temeljijo na mehanski, kemijski in termalni lizi. Termalna liza (metoda EZ) je bila v primerjavi z SD1x metodo bolj učinkovita pri *S. aureus* kot pri MAA. To kaže na večjo temperaturno odpornost mikobakterij, kar sovpada z njihovimi fiziološkimi karakteristikami (debela, voskasta celična stena). Povečanje števila stresanj celic v stresalniku iz 1-krat (SD1x) na 3-krat (SD3x) je povečalo izkoristek izolirane DNK iz mikobakterij.



Slika 14: Kvantitativna primerjava učinkovitosti različnih protokolov za izolacijo DNK iz mikobakterij
Okrajšave testiranih protokolov so razložene v Materialih in metodah, poglavje 3.5.2.
Figure 14: Quantitative comparison of efficiency of different protocols for DNA extraction from mycobacteria

Tudi kvalitativna analiza izolirane DNK z gelsko elektroforezo je pokazala podobne trende kot meritve koncentracij DNK. Kvalitativno največ DNK smo dobili pri SH, SD3x in SD-SH metodi, najmanj pri EZ metodi. Velikost fragmentirane DNK se je pri večini metod gibala med 10 in 11 kbp, nekoliko manjše odseke (od 2 do 5 kb) smo dobili pri EZ metodi. SH in SD-SH sta kazale ostanke visokomolekularne DNK, kompleksirane s celičnimi strukturami, ki ni potovala v gelu (Slika 15, v žepkih na vrhu kolone). Pri SH metodi sta vidni dodatni distinktivni lisi pri cca 1,5 kbp in 2,3 kbp (Slika 15, kolona SH), kar je verjetno ribosomalna RNK (16S in 23S rRNK), ki smo jo izolirali poleg DNK s to metodo.



Slika 15: Analiza kvalitete DNK izolirane z različnimi metodami
Figure 15: Analysis of quality of DNA extracted with different protocols

Za nadaljnje poskuse smo izbrali metodo SD3x, ki je kazala zelo visoko učinkovitost izolacije DNK, poleg tega v postopku ni vsebovala čiščenja s fenol/kloroformom, kot ostale metode s primerljivo učinkovitostjo (SH in SD-SH). S tem smo se izognili rokovanju s to strupeno kemikalijo.

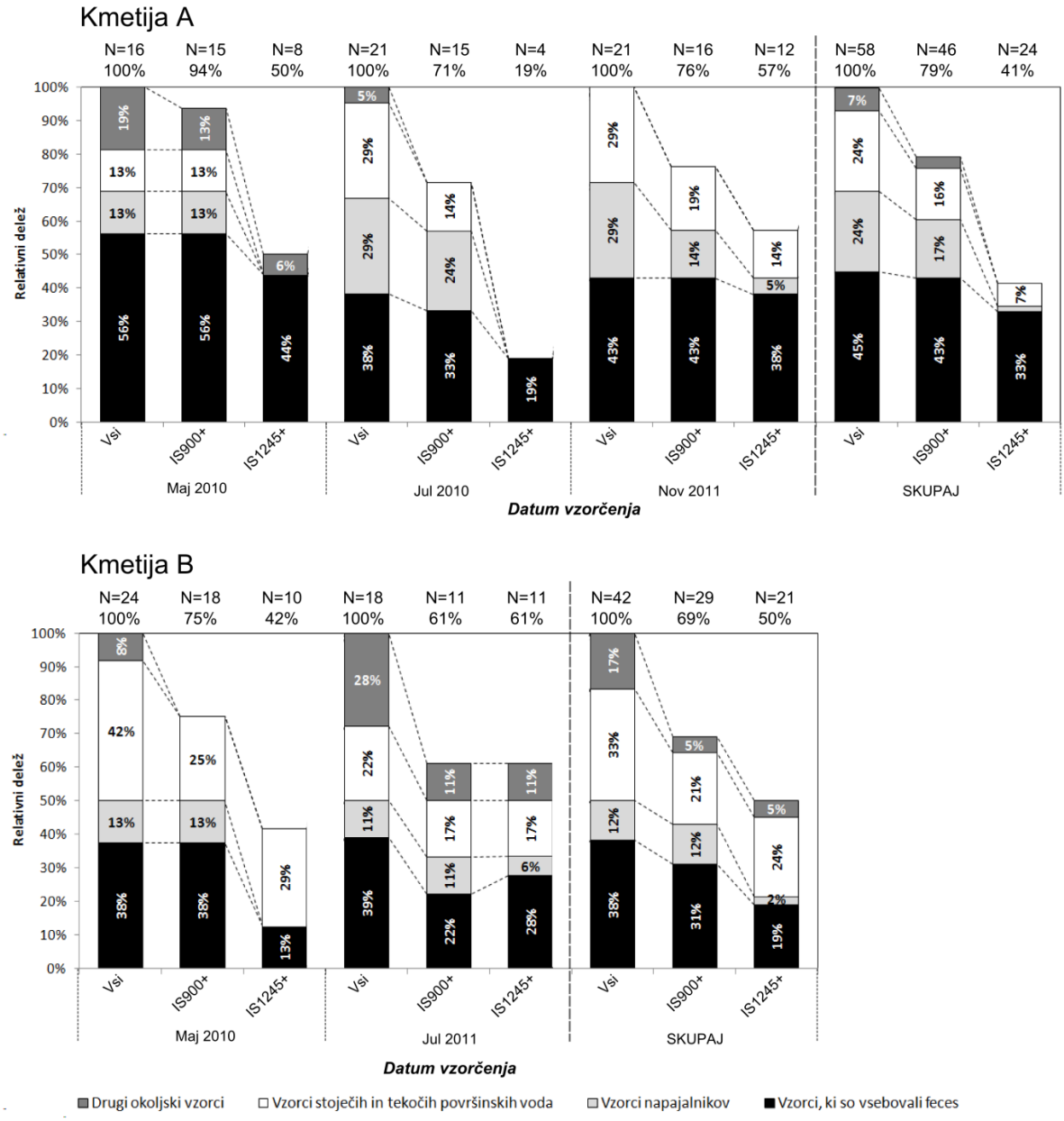
4.2 DETEKCIJA IS*900* IN IS*1245* V OKOLJSKIH VZORCIH

4.2.1 Specifičnost pomnoževanja IS*900* in IS*1245*

Skupno smo zajeli 58 vzorcev iz 33 različnih vzorčnih mest na kmetiji A in 42 vzorcev iz 30 različnih vzorčnih mest na kmetiji B. V vseh vzorcih smo z Real-time PCR kvantificirali IS*900* in določili prisotnost za MAA in MAH značilno IS*1245*. Specifičnost pomnoževanja smo preverili s sekveniranjem pomnožkov iz več naključno izbranih pozitivnih PCR reakcij. Vsa določena zaporedja pomnožkov IS*900* so bila identična zaporedju IS*900 M. avium ssp. paratuberculosis* iz baze nukleotidnih zaporedij (Genebank ID:AF416985), le pri treh zaporedjih smo zasledili 1 SNP, kar za MAP ni neobičajno (Castellanos in sod., 2009a) (Priloga A). V primeru IS*1245* je bila uspešnost sekveniranja slabša zaradi nizkih koncentracij pomnožkov, vendar so bila vsa uspešno določena zaporedja IS*1245* pomnožkov identična zaporedju IS*1245 Mycobacterium avium sp.* iz baze nukleotidnih zaporedij (Genebank ID: L33879) (Priloga A).

4.2.2 Porazdelitev IS*900* in IS*1245* pozitivnih vzorcev v okolju

Zaradi lažje obravnave smo vzorce glede na izvor razdelili na 4 razrede: i) vzorci, ki so vsebovali (goveji) feces ii) vzorci napajalnikov, iii) vzorci stoječih in tekočih površinskih voda in iv) drugi okoljski vzorci (Priloga B).



Slika 16: Porazdelitev IS*900* in IS*1245* na kmetijah A in B
IS*900* je specifični marker za MAP, IS*1245* je specifični marker za MAA in MAH. V stolpcu '*vsi*' je prikazana sestava vseh odvzetih vzorcev, v stolpcu 'IS*900*+' samo IS*900* pozitivni vzorci in v stolpcu 'IS*1245*+' samo IS*1245* pozitivni vzorci. Nad posameznim stolpcem je podano število vzorcev (N) in relativni delež (%) med vsemi odvzetimi vzorci.

Figure 16: Distribution of IS*900* and IS*1245* on farms A and B
IS*900* is specific for MAP, IS*1245* for MAH and MAA. Column 'vsi' is showing composition of all samples, column 'IS900+' only IS*900* positive samples and column "IS*1245*+' only IS*1245* positive samples. Above each column is the corresponding number of samples (N) and the proportion (%) among all collected samples.

Primerjava prisotnosti IS med kmetijama

Na obeh kmetijah je bila prisotnost IS*900* bolj pogosta kot IS*1245*. Na kmetiji A smo IS*900* zaznali bolj pogosto (79 %) kot na kmetiji B (69 %), IS*1245* pa bolj pogosto na kmetiji B (50 %) kot na kmetiji A (41 %) (Slika 16).

Porazdelitev IS po razredih vzorcev in primerjava med kmetijami

Na kmetiji A je bila večina vzorcev, ki so vsebovali feces, pozitivna za IS*900* in IS*1245*. V ostalih razredih je bil delež IS*900* pozitivnih vzorcev večinoma nižji, vendar proporcionalno deležu teh vzorcev med vsemi vzorci. Za razliko smo IS*1245* na kmetiji A zaznali skoraj izključno v vzorcih, ki so vsebovali feces.(Slika 16).

Na kmetiji B je bila porazdelitev IS*900* podobna kot na kmetiji A. Največ pozitivnih za IS*900* je bili ponovno med vzorci, ki so vsebovali feces. Porazdelitev IS*1245* je bila drugačna kot na kmetiji A. Izmed vzorcev, ki so vsebovali feces, je bilo manj pozitivnih za IS*1245* kot na kmetiji A. Precej večji je bil delež prisotnosti IS*1245* v vzorcih stoječih in tekočih površinskih voda, vzorcih iz napajalnikov in drugih okoljskih vzorcev (Slika 16).

Sezonska dinamika prisotnosti IS*900* in IS*1245*

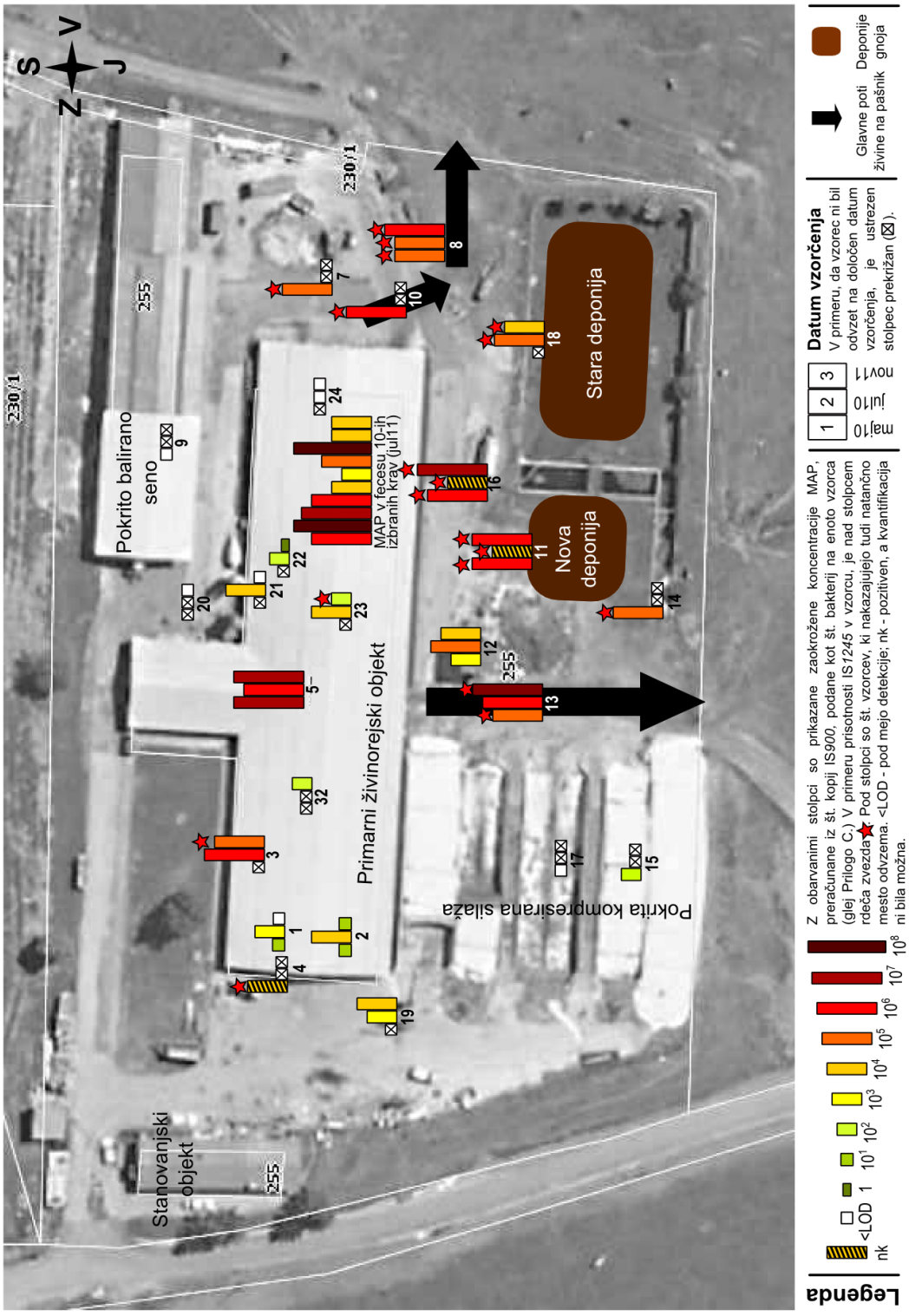
Prisotnost IS*900* na kmetiji A je bila dokaj stabilna med različnimi datumi vzorčenja. Največ pozitivnih vzorcev je bilo maja 2010 (94%), nekoliko manj julija 2010 (71 %) in novembra 2011 (76 %). Porazdelitev pozitivnih vzorcev med različnimi razredi vzorcev je bila podobna na vse datume vzorčenja. Prisotnost IS*1245* je bila največja novembra 2011 (57 %), sledil je maj 2010 (50 %), julija 2010 je padla na 19 %. Na ta datum so bili pozitivni le vzorci, ki so vsebovali feces (Slika 16).

Na kmetiji B je bila prisotnost IS*900* prav tako stabilna kot na kmetiji A, nekoliko manj pozitivnih vzorcev je bilo julija 2011. IS*1245* je bila bolj pogosta julija 2011 kot maja 2010. Porazdelitev med razredi vzorcev je bila julija 2011 enakomerna in podobna kot pri IS*900*, maja je bila večina IS1245 pozitivnih iz razreda površinskih voda (Slika 16).

Geografska porazdelitev IS*900* in IS*1245*

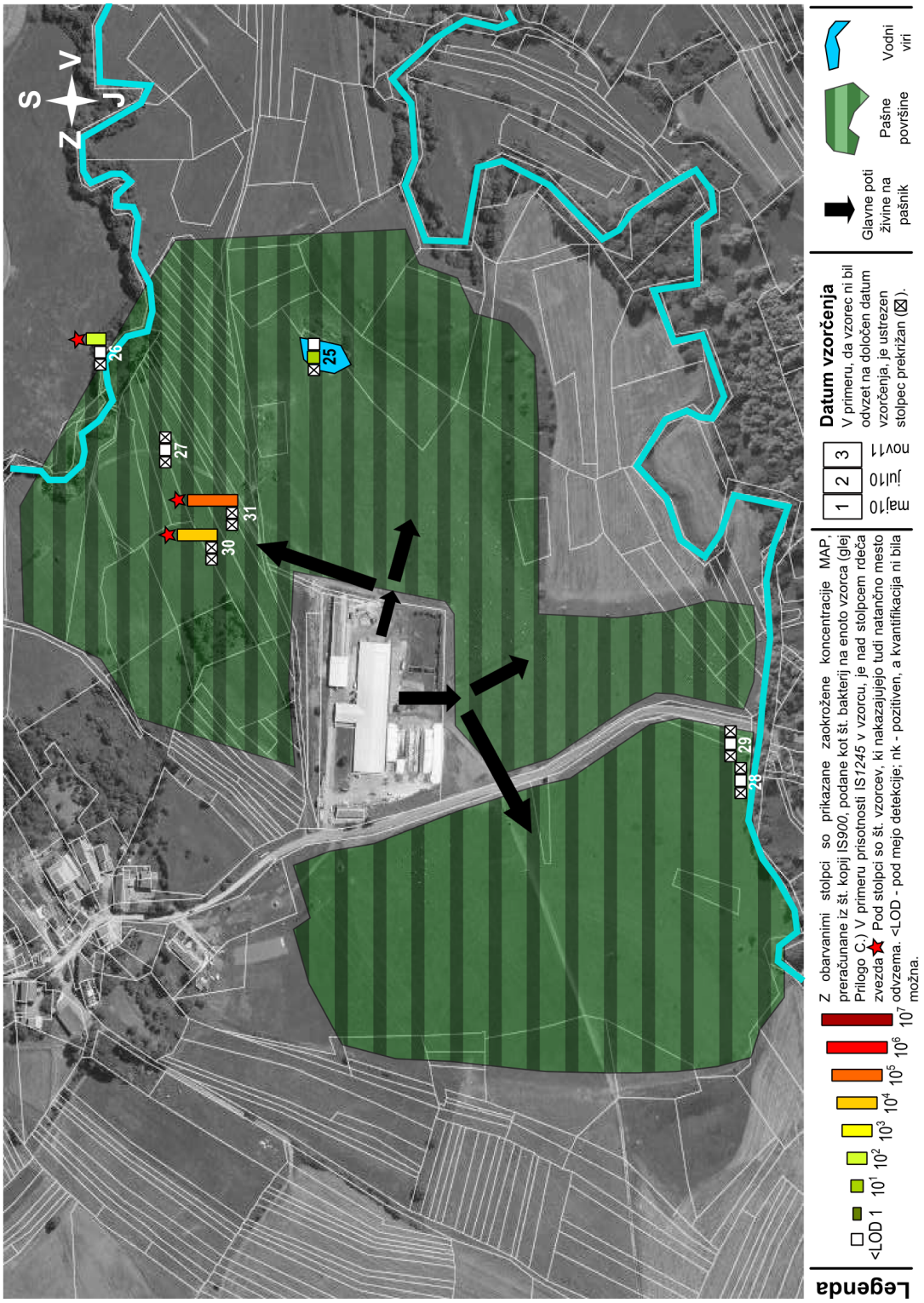
Iz geografskih kart je razvidno, da je bila IS*900* na kmetiji A prisotna tako znotraj kot zunaj živinskih objektov, vendar večinoma (in količinsko največ) v vzorcih, ki so bili v stiku s fecesom. To so tla hleva, poti živine na pašnik, deponije gnoja in tla ob krmilnikih na pašniku. V ostalih vzorcih smo zaznali precej manjše število kopij IS*900* (napajalniki v hlevu, silaža, stoječa voda pred vhodom v živinski objekt, okoliški vodni viri, itn. (Slika 17 in 18, popis vzorcev v Prilogi C). IS*1245* smo zaznali večinoma v vzorcih zunaj živinskih objektov (19/30 pozitivnih vzorcev zunaj proti 3/19 vzorcev znotraj objektov).

Tudi na kmetiji B je bila IS*900* prisotna znotraj in zunaj živinskih objektov, v vzorcih, ki so bili v stiku s fecesom. Visoko število kopij IS900 smo za razliko od kmetije A, zaznali tudi v nekaterih ostalih vzorcih, kot so napajalniki v hlevu 2 in tekočih površinskih vodah. IS1245 je bila ponovno bolj pogosto prisotna v vzorcih zunaj živinskih objektov (20/30 pozitivnih vzorcev zunaj proti 1/10 pozitivnih vzorcev znotraj objektov) (Slika 19 in 20, popis vzorcev v Prilogi C).

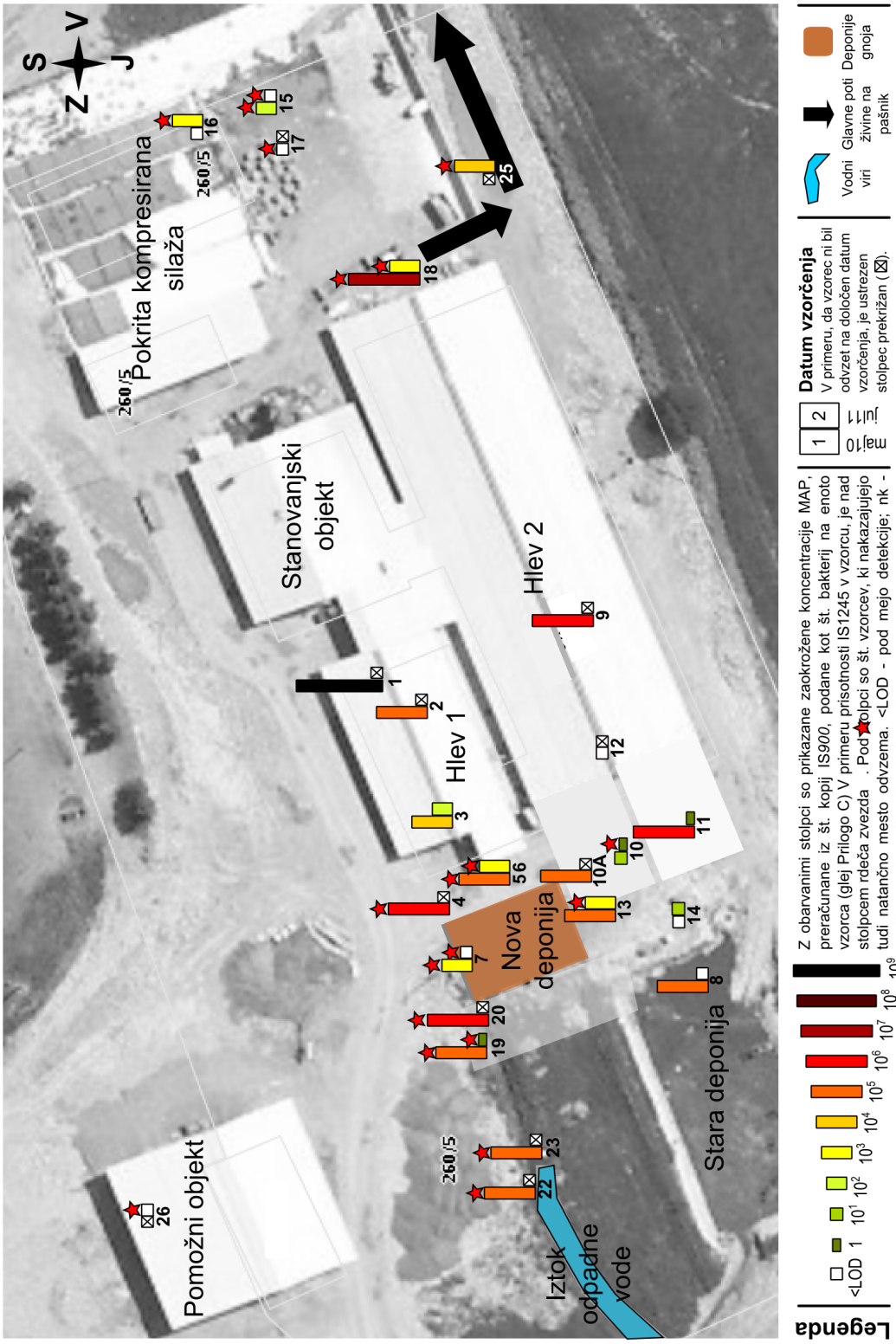


Slika 17: Geografska porazdelitev IS*900* in IS*1245* pozitivnih vzorcev na kmetiji A in v bližnji okolici. Detekcija IS*1245* v vzorcih fecesa izbranih krav ni bila izvedena.

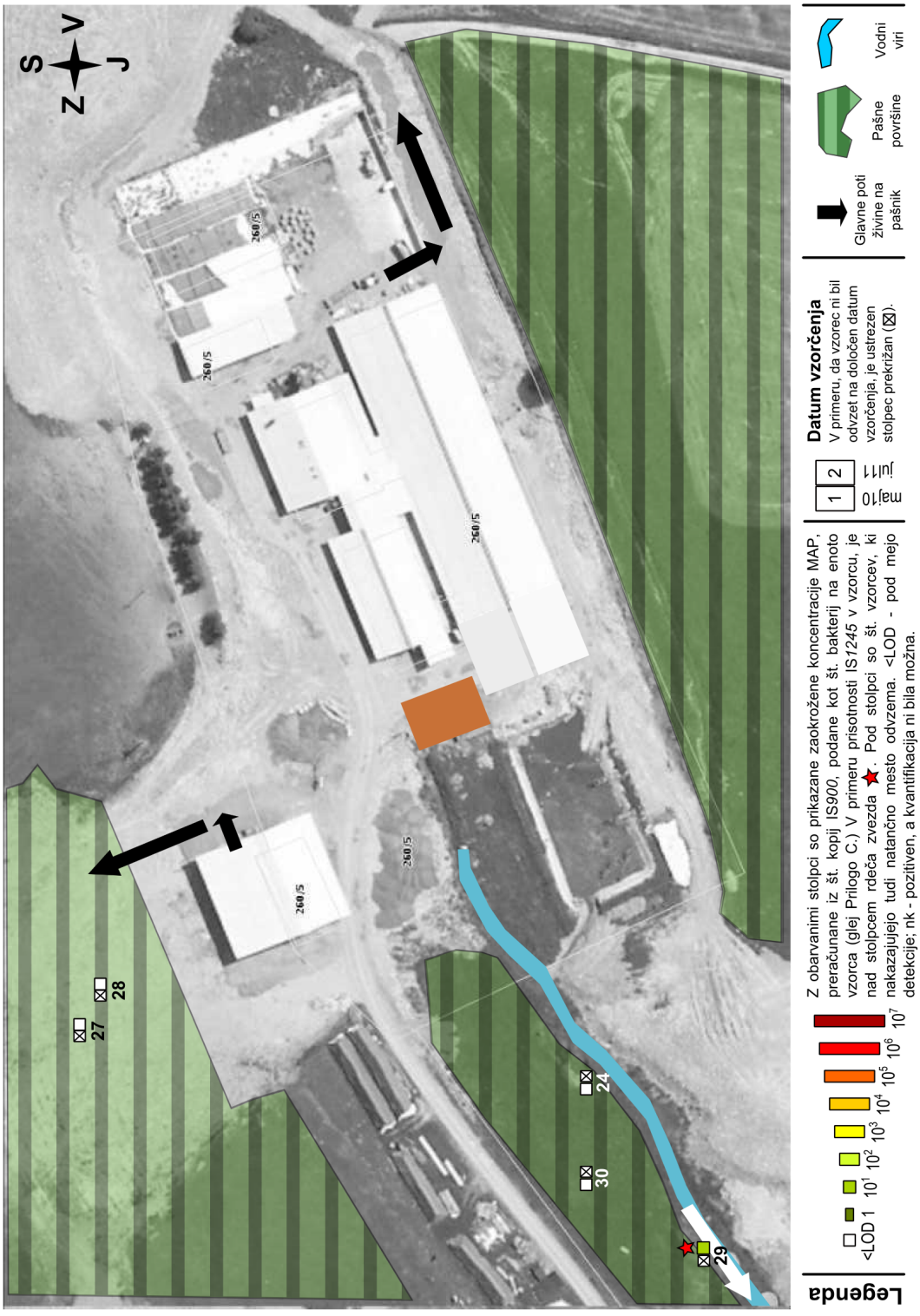
Figure 17: Geographical distribution of IS*900* and IS*1245* positive samples on farm A. Faecal samples of selected cows were not tested for the presence of IS*1245*.



Slika 18: Geografska porazdelitev IS*900* in IS*1245* pozitivnih vzorcev v širši okolici kmetije A
Figure 18: Geographical distribution of IS*900* and IS*1245* positive samples in the surroundings of farm A



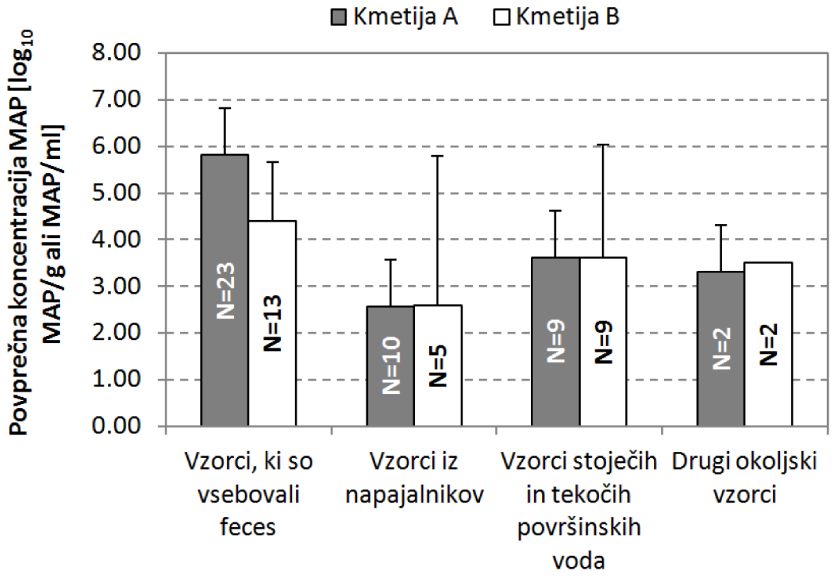
Slika 19: Geografska porazdelitev IS*900* in IS*1245* pozitivnih vzorcev na kmetiji B in v bližnji okolici
Figure 19: Geographical distribution of IS*900* and IS*1245* positive samples in on farm B



Slika 20: Geografska porazdelitev IS*900* in IS*1245* pozitivnih vzorcev na v širši okolici kmetije B
Figure 20: Geographical distribution of IS*900* and IS*1245* positive samples in the surroundings of farm B

4.2.3 Analiza rezultatov kvantifikacije IS*900*

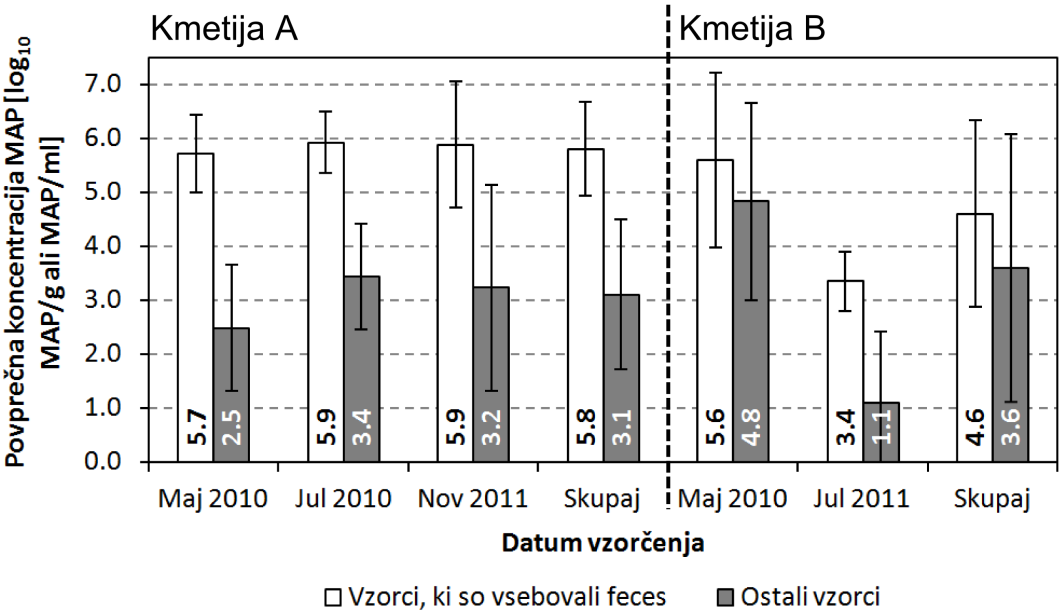
Kvantifikacija IS*900* je pokazala, dej je bila na kmetiji A povprečna koncentracija MAP v vzorcih, ki so vsebovali feces, približno 25-krat višja kot na kmetiji B (p=0,001, Slika 21), medtem ko se povprečne koncentracije MAP v ostalih razredih vzorcev niso statistično razlikovale med kmetijama (p>0.05). Na obeh kmetijah so bile najvišje koncentracije MAP v vzorcih, ki so vsebovali feces (Slika 21).



Slika 21.: Primerjava števila kopij IS*900* po razredih vzorcev
Števila kopij IS*900* smo preračunali v koncentracije MAP (glej metode) in jih podali v desetiških logaritmih. V stolpcih je prikazano število vzorcev (N) v posameznem razredu. Znotraj posameznih razredov so bile zaradi raznolikosti vzorcev deviacije v koncentraciji MAP velike.
Figure 21: Comparison of IS*900* copy numbers across different classes of samples
Copy numbers were used to calculate concentrations of MAP (see methods), which are shown in logarithms with a base of 10. Inside bars are numbers of samples (N) in each class. High deviations reflect high diversity of samples in each class.

Povprečne koncentracije v ostalih razredih se niso bistveno razlikovale med seboj (p>0,05), zato smo jih za analize sezonskega gibanja koncentracij MAP združili v en razred ('ostali vzorci' na Sliki 22) in tako povečali statistično moč.

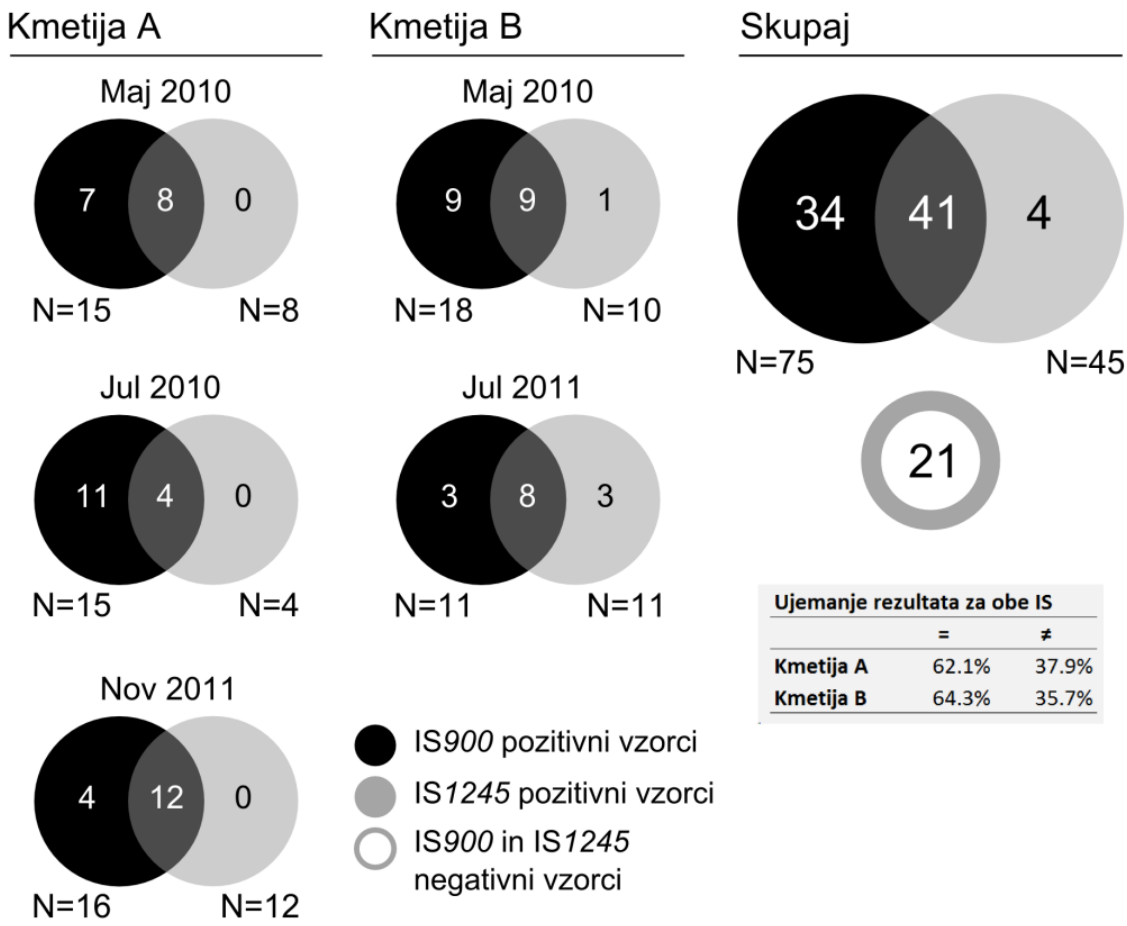
Na kmetiji A nismo opazili sezonskih sprememb v gibanju koncentracij MAP, ne v vzorcih, ki so vsebovali feces, ne v ostalih vzorcih (p>0,05, Slika 22). Po drugi strani smo na kmetiji B julija 2011 zaznali znižanje koncentracije MAP v obeh razredih vzorcev v primerjavi z majem 2010. Povprečne koncentracije MAP v vzorcih, ki so vsebovali feces, so bile v juliju 2011 za približno 2 $\log_{10}$ nižje (iz $4{,}0 \cdot 10^5$ na $2{,}5 \cdot 10^5$ MAP/g ali ml, p=0,022), v ostalih vzorcih pa za 3 $\log_{10}$ nižje (iz $6{,}3 \cdot 10^4$ na $1{,}3 \cdot 10^1$ MAP/g ali ml, p<0.001) kot maja 2010. Podobno so bile povprečne julijske koncentracije MAP na kmetiji B precej nižje tudi od koncentracij MAP na vse datume vzorčenja na kmetiji A, v obeh razredih vzorcev (Slika 22).



Slika 22: Primerjava števila kopij IS*900* po datumih vzorčenja
Števila kopij IS*900* smo preračunali v koncentracije MAP (glej metode) in jih podali v desetiških logaritmih. V stolpcih so prikazane natančne vrednosti koncentracij MAP.
Figure 22: Comparison of IS*900* copy numbers at different sampling dates
Copy numbers were used to calculate concentrations of MAP (see methods), which are shown in logarithms with a base of 10. Inside bars are exact values of MAP concentration.

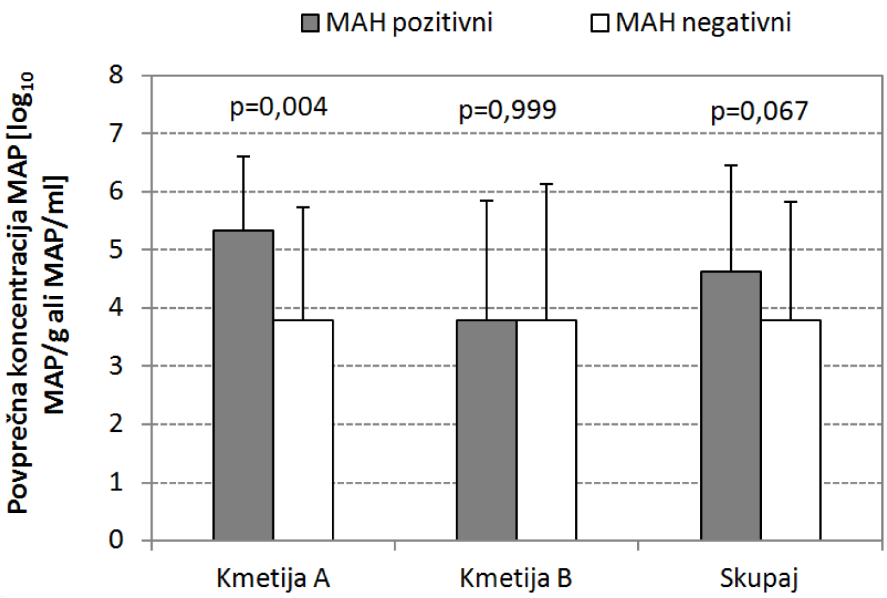
4.2.4 Povezava med prisotnostjo IS*900* in IS*1245*

V povezavi z hipotezo, da si MAP deli življenjski prostor z drugimi sorodnimi mikobakterijami, ki bi lahko prispevale mikobaktin za privzem železa MAP v okolju izven gostitelja, smo preverili kakšna je povezava med prisotnostjo IS*900* in IS*1245*. Obe IS hkrati sta bili prisotni v kar 41 % vzorcev in obe hkrati odsotni v 21 % vzorcev (Slika 23). Samo IS*900* je bila prisotna v 34 %, samo IS*1245* pa le v 4 % vzorcev (Slika 23). To kaže na odvisno povezavo med IS*900* in IS*1245* (χ^2=9,82, *df*=1, p=0,0017). V primeru prisotnosti ene IS obstaja večja verjetnost, da je prisotna tudi druga IS, kot v primeru odsotnosti IS (razmerje obeti OR=6,33, 95% interval zaupanja CI(95%)=1,98-20,23). Glede na to, da je kar 91,1 % IS*1245* pozitivnih vzorcev pozitivnih tudi za IS*900*, je prisotnost IS*1245* dober prediktor za prisotnost IS*900*, medtem ko je obratna povezava slabša, saj je le 54,7 % IS*900* pozitivnih vzorcev pozitivnih tudi za IS*1245*. Iz komplementarne povezave sledi, da je odsotnost IS*900* dober prediktor za odsotnost IS*1245* (pravilna v 84,0 % primerih), medtem ko je obratna povezava slabša (pravilna le v 38,2 % primerih). Vsega skupaj je bil delež vzorcev, ki so se ujemali po rezultatu, t.j. hkrati pozitivni ali hkrati negativni za obe IS, zelo podoben na obeh kmetijah, 62,1 % na kmetiji A in 64,3 na kmetiji B (Slika 23). Povezava med prisotnostjo obeh IS je bila podobna ob vseh datumih vzorčenja in na obeh kmetijah (Slika 23).



Slika 23: Vennovi diagrami povezave med IS*900* in IS*1245*
Prikazane so nominalne vrednosti, ki so zaradi št. vseh vzorcev (n=100) enake relativnim frekvencam. Pod vsakim krogom je navedeno število (N) vseh pozitivnih vzorcev za IS*900* (pod črnimi krogi) in IS*1245* (pod sivimi krogi). Število negativnih vzorcev za obe IS je zaradi preglednosti prikazano samo v skupnem seštevku.
Figure 23: Venn diagrams for correlation between IS*900* and IS*1245*
Shown are nominal values, which are equivaalent to relative frequncies (because N=100). Below the circles, numbers of all IS*900* positive samples (below black circles) and IS*1245* positive smples (below grey circles) are given. For better clarity, the numbers of negative samples for both IS are only given for cumulative Venn diagram.

Analiza koncentracij MAP je pokazala, da so na kmetiji A povprečne koncentracije MAP v IS*1245* pozitivnih vzorcih približno 35-krat višje kot v IS*1245* negativnih vzorcih ($2{,}1 \cdot 10^5$ v primerjavi z $6{,}1 \cdot 10^3$ MAP/g ali ml, p=0,004, Slika 24). Na kmetiji B razlik v koncentraciji MAP med IS*1245* pozitivnimi in negativnimi nismo zaznali (p=0,999). Združeni vzorci iz obeh kmetij so kazali 7-krat višjo povprečno koncentracijo MAP v vzorcih, pozitivnih za IS*1245* v primerjavi z IS*1245* negativnimi vzorci ($4{,}3 \cdot 10^4$ proti $6{,}1 \cdot 10^3$ MAP/g ali ml, p=0,067, Slika 24).



Slika 24: Primerjava števila kopij IS*900* v IS*1245* pozitivnih in negativnih vzorcih
Števila kopij IS*900* smo preračunali v koncentracije MAP (glej metode) in jih podali v desetiških logaritmih. Nad stolpci so prikazane *p* vrednosti za primerjave (dvosmerni *t*-test).
Figure 24: Comparison of IS*900* copy numbers in IS*1245* positive and negative samples
Copy numbers were used to calculate concentrations of MAP (see methods), which are shown in logarithms with a base of 10. Above bars are *p*-values for comparisons between MAP concentrations in IS*1245* positive and negative samples (two-sided *t*-test).

4.3 INTERAKCIJE MED PODVRSTAMI BAKTERIJE *Mycobacterium avium* IN OKOLJSKIMI AMEBAMI

4.3.1 Prisotnost ameb v vzorcih iz okolice kmetij in izolacija ameb

Za namene študij interakcije ameb z MAP in ostalimi mikobakterijami, smo želeli izolirati amebe, ki si delijo življenjski prostor z MAP. V vzorcih majskega vzorčenja 2010 iz obeh kmetij smo zaznali prisotnost ameb v večini analiziranih vzorcev (Priloga D1). Izmed vzorcev, kjer smo z mikroskopsko analizo zaznali prisotnost ameb in hkrati ugotovili prisotnost IS*900* z Real-time PCR, smo izolirali tri homogene skupine ameb (intervariabilnost v nukleotidnem zaporedju 18S rRNK (dolžina ~1200 nt) < 1 %), z najbližjimi zadetki iz rodov *Hartmannella*, *Acanthamoeba* in *Vannella* (Preglednica 11). Slike izoliranih ameb so zbrane v Prilogi D2.

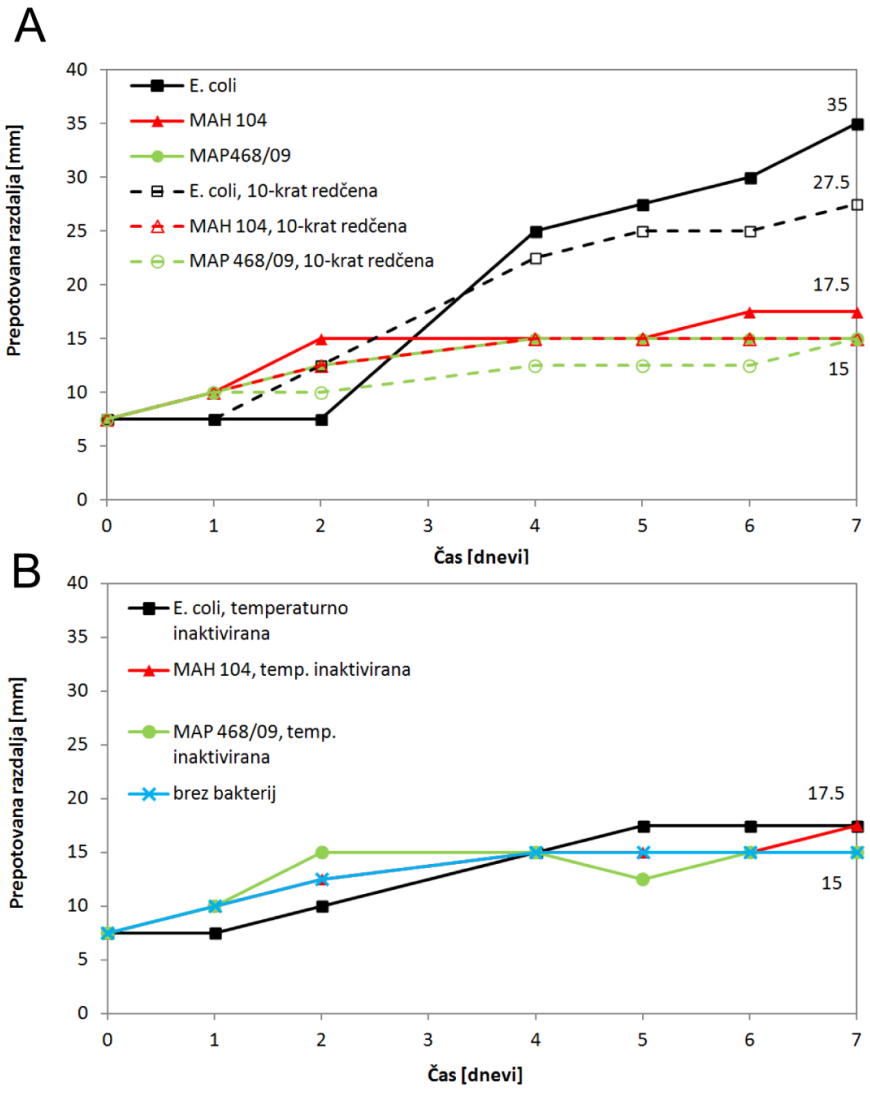
Preglednica 11: Identifikacija pomnožkov gena za 18S rRNK iz izoliranih ameb z uporabo EukA/EukB seta začetnih nukleotidov
Table 11: Identification of 18S rRNA gene amplicons from isolated amoebae using EukA/EukB primer set

N[a]	*Prva dva zadetka v bazi Genebank z uporabo BLAST*	*Genebank ID*	*Podobnost (%)*
17	*Hartmannella sp.* GERF2	HM363627.1	100
	Hartmannella vermiformis clone 4391	DQ084364.1	100
1[b]	*Acanthamoeba sp.* GERF3	HM363628.1	99
	Acanthamoeba sp. AcaVN08	GQ397470.1	99
4	*Acanthamoeba hatchetti* strain 2HH	AF260722.1	99
	Acanthamoeba sp. SM6_6A	AB425948.1	99
15	*Vannella persistens* strain CCAP 1589/13 clone A132.6	GQ265374.1	98
	Vannella persistens strain CCAP 1589/13 clone A132.4	GQ265372.1	98

[a] Število kultur z enakim zaporedjem gena za 18S rRNK
[b] Izolat iz očesne mrežnice, pridobljen iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani

4.3.2 Prehranjevanje ameb z mikobakterijami

Poskusi sposobnosti prehranjevanja ameb *Acanthamoeba sp.* z *E. coli* so pokazali, da več kot je bilo na voljo bakterij za prehranjevanje, bolje so se amebe razmnoževale in dlje so potovale po površini agarja, stran od mesta inokulacije (Slika 25). Kadar so bile edini vir hrane bakterije MAP 468/09 ali MAH 104, v istem razmerju kot v poskusih z *E. coli*, je *Acanthamoeba sp.* kazala omejeno potovanje, razmnoževanja pa nismo opazili. Tako potovanje kot razmnoževanje *Acanthamoebe sp.* v prisotnosti mikobakterij sta bila enaka kot v negativni kontroli (amebe brez bakterij) (Slika 25 in Preglednica 12).



Slika 25: Sposobnost prehranjevanja amebe *Acanthamoeba sp.* KC z različnimi bakterijami
Sposobnost prehranjevanja amebe z bakterijami je prikazana kot potovanje ameb po površini v času. A – žive bakterije (neredčene in 10-krat redčene); B – termično inaktivirane bakterije (neredčene) in kontrola brez bakterij. Prikazana je ena izmed treh ponovitev poskusa.
Figure 25: Feeding capability of *Acanthamoeba sp.* KC on different bacteria
Feeding capability is presented as time dependent migration of amoeba over the surface of agar. A – live bacteria (undiluted and 10-times diluted); B – thermally inactivated bacteria (undiluted) and control without bacteria. One representative experiment is shown.

Pri *Hartmannelli sp.* širjenja po petrijevki nismo mogli opazovati, ker je že po krajši prepotovani razdalji izven inokulacijskega območja tvorila ciste. Zato smo razmnoževanje opazovali kot porast števila trofozoit na površini notranjega kroga v petrijevki. Tudi *Hartmannella sp.* se ni razmnoževala v prisotnosti MAH in MAP, za razliko je živa *E. coli* dobro podpirala razmnoževanje *Hartmannelle sp.* (Preglednica 12). Termično inaktivirane *E. coli*, MAH in MAP niso podpirale razmnoževanja *Acanthamoebe sp.* KC, potovanje po petrijevki je bilo podobno, kot v poskusu brez dodanih bakterij za hrano. Za *Hartmannello sp.* in okoljski izolat *Acanthamoebe sp.*(v nadaljevanju oznaka B3) poskusov z mrtvimi/inaktiviranimi bakterijami nismo izvedli.

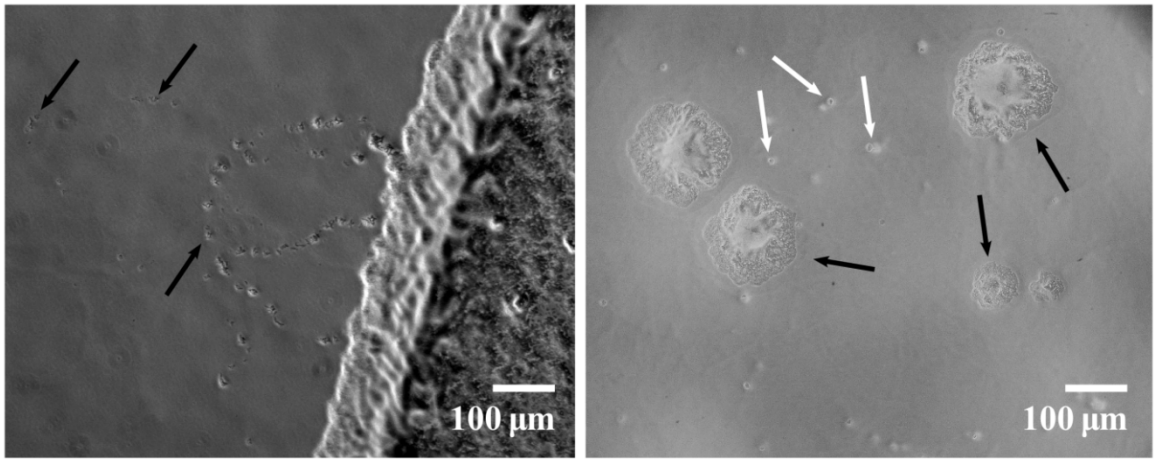
Preglednica 12: Sposobnost prehranjevanja ameb *Acanthamoeba sp.* B3 in *Hartmanella sp.* z mikobakterijami Število ameb se po 2. dnevu ni več spreminjalo. Skupni čas gojenja je bil 10 dni.
Table 12: Feeding capability of *Acanthamoeba sp.* B3 and *Hartmannella sp.* on different bacteria Number of amoeba did not change after the 2nd day. Total incubation time was 10 days.

	Število ameb v notranjem krogu (S=1,76 cm^2)			
Dan 1	**brez bakterij**	**E. coli**	**MAH 104**	**MAP 468/09**
Acanthamoeba sp. B3	~20	~20	~20	~20
Hartmannella sp.	~20	~20	~20	~20
Dan 2	**brez bakterij**	**E. coli**	**MAH 104**	**MAP 468/09**
Acanthamoeba sp. B3	<20	>200	<20	<20
Hartmannella sp.	<20	>200	<20	<20

4.3.3 Preživetje mikobakterij v amebah iz rodu *Acanthamoeba*

V primeru, da so amebe fagocitirale mikobakterije in so le te vsaj delno preživele internalizacijo, smo pričakovali pojav satelitskih kolonij mikobakterij izven mesta inokulacije, na mestih liziranih ameb.

V poskusih prehranjevanja ameb z mikobakterijami na NN agarju satelitskih kolonij MAH in MAP nismo opazili. Tako MAH 104 kot *E. coli* sta počasi, a konsistentno rastli in tvorili drobne kolonije na mestu inokulacije na NN agarju, medtem ko pri MAP 468/09 rasti v 15 dneh nismo opazili. Majhni skupki MAH bacilov so se nahajali le maksimalno 0,5 cm od roba mesta inokulacije z mikobakterijami in so bili raztreseni po sledi potovanja amebe (v NN agarju dobro viden kot vdrt kanal) (Slika 26, levo). Tekom poskusa smo večkrat opazili, da se bacili sprijemajo z amebami, ki jih na krajše razdalje vlečejo za seboj.



Slika 26: Rast bakterij MAH 104 izven območja inokulacije
Levo – majhni skupki bacilov MAH 104 (črne puščice) izven mesta inokulacije (temnejše polje na desni) na poti gibanja ameb na NN agarju; *Desno* – večje kolonije MAH 104 (črne puščice) izven mesta inokulacije na 7H10 agarju; amebe, ki so močno skrčene (pred fazo tvorjenja cist), so označene z belimi puščicami. Obe sliki pri 100-kratni povečavi s faznim kontrastom.
Figure 26: Growth of MAH 104 outside the inoculation area
Left – small groups of MAH 104 bacilli (black arrows) outside inoculation area on NN agar; *Right* – larger colonies of MAH 104 (black arrows) outside inoculaton area on 7H10 agar; amoebae are marked with white arrows. Both pictures taken at 100-fold magnification, with phase contrast.

Do podobnih rezultatov smo prišli, ko smo namesto NN agarja uporabili 7H10 agar z dodatkom mikobaktina, le da so v tem primeru bile kolonije MAH 104 nekoliko dlje od

roba mesta inokulacije (<1,5 cm od roba), sprva skupki celic pa so zrasli v večje kolonije po 10 dnevni inkubaciji na 37 °C (Slika 26, desno). Pri MAP 468/09 tudi na 7H10 rasti izven mesta inokulacije v 10 dneh inkubacije na 37 °C nismo zaznali.

4.4 PRIMERJALNA GENOMIKA *mbt* OPERONOV

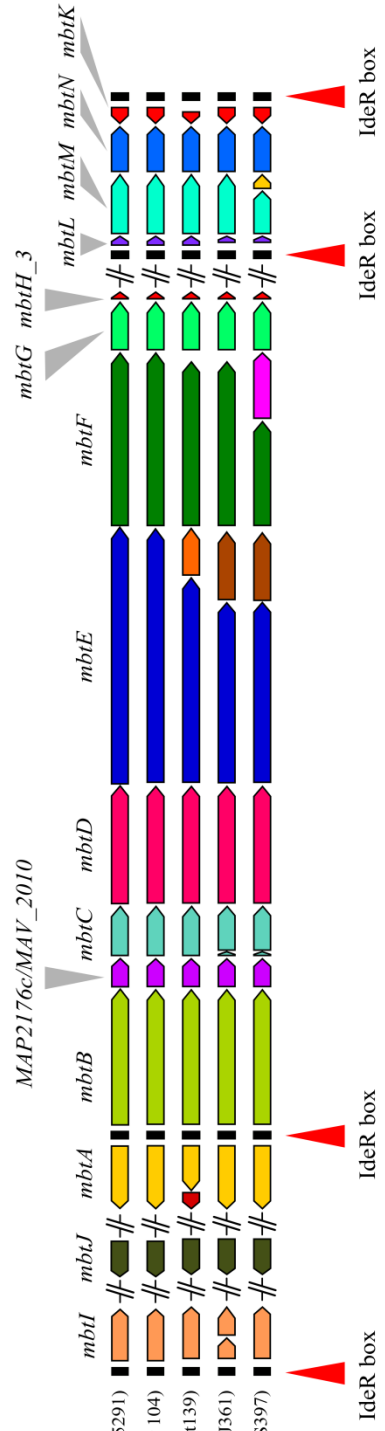
4.4.1 Primerjava celotnih *mbt* operonov različnih podvrst bakterije *Mycobacterium avium*

Izvedli smo detajlno primerjavo *mbt* operonov različni podvrst *Mycobacterium avium* kot tudi različnih sevov MAP. S tem smo skušali ugotoviti, ali na genotipski ravni obstaja razlika v *mbt* operonih, ki bi lahko pojasnila nezmožnost produkcije mikobaktina pri MAP. Pri tem smo se osredotočili predvsem na insercije/delecije ali nesinonimne SNP-je, ki bi lahko kakorkoli spremenile ORF-je.

Iz Slike 27 je razvidno, da imata MAH 104 (v nadaljevanju MAH) in MAA ATCC25291 (v nadaljevanju samo MAA) popolnoma ohranjene vse ORF-je v *mbt* operonih. Pojavljajo se manjše razlike v dolžini posameznih ORF (največ 20 nt), ki *in silico* ne vplivajo na aminokisline v aktivnih mestih prevedenega transkripta (Preglednica 13). Za razliko smo pri različnih tipih MAP opazili več sprememb v ORF-jih v primerjavi z MAH in MAA, ki niso enotne za vse tipe MAP.

Razlike v *mbt-1* operonu

ORF za *mbtI* je pri ovčjem tipu I razcepljen na dva manjša ORF-ja zaradi nesmiselne mutacije, pri ovčjem tipu III in govejem tipu MAP (tip II) pa enak kot pri MAA in MAH. ORF za *mbtA* je skrajšan le pri govejem sevu tipa II (za 453 nt) zaradi večjega delecijskega/insercijskega dogodka, zaradi česar manjka zapis za ATP vezavni motiv na C-terminalnem koncu. ORF za *mbtC* je pri obeh ovčjih tipih razcepljen na dva nova ORF-ja zaradi nesmiselne mutacije, ki povzroči zgodnji stop kodon. Drugi ORF se sicer nadaljuje v istem bralnem okvirju kot originalni ORF. ORF za *mbtE* je razcepljen na dva ORF-ja zaradi delecije in zgodnjega stop kodona, vendar se razcep med ovčjimi in govejimi tipi razlikuje. ORF za *mbtF* je skrajšan pri govejem sevu tipa II in ovčjem sevu tipa I zaradi premika bralnega okvirja proti koncu originalnega ORF in zgodnjega stop kodona. Pri ovčjem sevu tipa III pa je razcepljen na dva različna ORF.



Slika 27: Grafična primerjava *mbt* operonov pri različnih podvrstah *Mycobacterium avium*. Rdeče puščice kažejo na predvidena IdeR vezavna mesta. Z ležečimi barvnimi puščicami so prikazani predvideni odprti bralni okvirji (ORF) *mbt* genov. Prikazane dolžine ORF so v sorazmerju z dejanskimi. ORF-ji, ki niso v preseku vseh primerjanih operonov, niso poimenovani. Dvojna poševna črta kaže, da sta ORF-ja ločena z daljšim nukleotidnim zaporedjem. Podatki o izvornih genomih se nahajajo v poglavju Metode in materiali, Preglednica 10.

Figure 27: Graphical comparison of *mbt* operons from different *M. avium* subspecies. Red arrows are indicating the predicted IdeR binding sites. Horizontal coloured arrows represent predicted open reading frames (ORF) of *mbt* genes. Shown ORF lengths are proportional to actual lengths. ORFs, which are not shared between all compared operons, are not named. Double lines between genes indicate separation by a longer stretch of nucleotide sequence. Info on the source genomes used for alignement of operons is given in Table 10.

Preglednica 13: Primerjava predvidenih odprtih bralnih okvirjev (ORF) v *mbt* operonih različnih podvrst *Mycobacterium avium*
MAP – *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*; MAH - *Mycobacterium avium* ssp. *hominissuis*; MAA - *Mycobacterium avium* ssp. *avium*; (*/*) – ORF ni prisoten; (odebeljen rdeč tisk) – ORF-ji se bistveno razlikujejo med *mbt* operoni.

Table 13: Comparison of open reading frames (ORF) in *mbt* operons of different *M. avium* subspecies
(*/*) – ORF not present; (bold, red) – ORFs are different between strains

	MAP K-10, CLIJ644, CLIJ623, Pt139 (goveji tip II)		*MAP CLIJ361 (ovčji tip I)*	*MAP S397 (ovčji tip III)*	*MAH 104*		*MAA ATCC 25291*
	ORF	ORF	ORF	ORF	ORF	ORF	ORF
Ime gena	*Oznaka lokusa*[1]	*Dolžina [nt]*	*Dolžina [nt]*	*Dolžina [nt]*	*Oznaka lokusa* [2]	*Dolžina [nt]*	*Dolžina [nt]*
***mbt-1* operon**							
mbtI (trpE2)	**MAP2205c**	**1353**	**561**	**1353**	**MAV_1792**	**1353**	**1353**
/	**/**	**/**	783	**/**	**/**	**/**	**/**
mbtJ (lipK)	MAP2179	1005	1005	1005	MAV_1798	1005	1005
neznan	**MAP2179**	**462**	**/**	**/**	**/**	**/**	**/**
mbtA	**MAP2178**	**1203**	**1656**	**1656**	**MAV_2008**	**1656**	**1638**
mbtB	MAP2177c	3498	3498	3498	MAV_2009	3498	3504
neznan	MAP2176c	765	729	729	MAV_2010	765	771
mbtC	**MAP2175c**	**1329**	**111**	**111**	**MAV_2011**	**1329**	**1329**
/	**/**	**/**	**1158**	**1158**	**/**	**/**	**/**
mbtD	MAP2174c	3042	3036	3042	MAV_2012	3042	3048
mbtE	**MAP2173c**	**5280**	**4638**	**4638**	**MAV_2013**	**6573**	**6576**
neznan	**MAP2172c**	**1266**	**1464**	**1464**	**/**	**/**	**/**
mbtF	**MAP2171c**	**4239**	**4239**	**2580**	**MAV_2014**	**4443**	**4440**
/	**/**	**/**	**/**	**1662**	**/**	**/**	**/**
mbtG	MAP2170c	1287	1287	1287	MAV_2015	1287	1287
mbtH_3	MAP2169c	216	216	216	MAV_2016	216	216
***mbt-2* operon**							
mbtK	**MAP1552**	**336**	**666**	**666**	**MAV_2875**	**660**	**666**
/	**Alternativni ORF**	**1830**	**/**	**/**	**/**	**/**	**/**
mbtN	MAP1553c	1176	1176	1176	MAV_2876	1176	1176
/	**/**	**/**	**/**	432	**/**	**/**	**/**
mbtM	**MAP1554c**	**1566**	**1566**	**1131**	**MAV_2874**	**1566**	**1566**
mbtL	**MAP1555c**	**306**	**186**	**186**	**MAV_2873**	**306**	**306**

[1] glede na anotacijo genoma MAP k-10 v Genebank, ID št.: NC_002944
[2] glede na anotacijo genoma MAH 104 v Genebank, ID št.: NC_008595

Razlike v *mbt-2* operonu

V *mbt-2* operonu je *mbtL* pri govejem sevu MAP enak kot pri MAH in MAA, pri obeh ovčjih tipih je skrajšan (manjka N-terminalna regija MbtL) in v drugem ORF-ju kot pri govejem tipu MAP. ORF za *mbtM* je razcepljen pri ovčjem tipu III, medtem ko je pri ovčjem tipu I in govejem tipu II enak kot pri MAA in MAH. Gen *mbtK* je pri govejem tipu II skrajšan (na N-terminalu MbtK) in v drugem ORF kot pri ovčjih tipih I, III ali pri MAH in MAA.

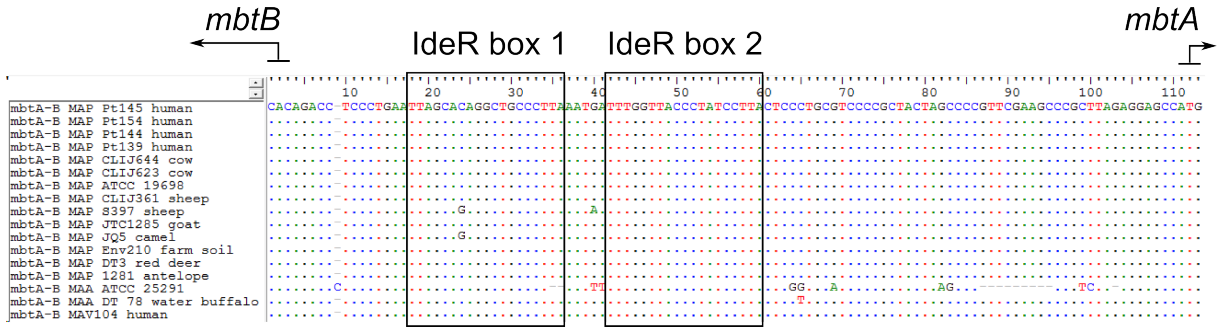
Če povzamemo, je pri vseh podvrstah bakterije *M. avium* popolnoma ohranjenih 7 od 15 ORF-jev (*mbtJBDGHN in MAP2176c*). MAP se razlikujejo od MAH in MAA v skupno 8 od 15 ORF-jev (*mbtIACEFLMK*). Od tega se ovčji sevi MAP tipa I razlikujejo od MAH/MAA v 5 od 15 ORF-jev (*mbtICEFL*), goveji sevi tipa II v 4 od 15 ORF-jev (*mbtAEFK*) in ovčji sevi tipa III v 5 od 15 ORF-jev (*mbtCEFLM*). ORF-ja, ki se razlikujeta od MAH/MAA pri vseh MAP tipih (presek) sta le *mbtE* in *mbtF*.

4.4.2 Primerjava IdeR vezavnih regij in drugih genov

Okvara sinteze mikobaktina bi lahko izhajala tudi iz mutacij v regulatornih regijah *mbt* operonov, zato smo izvedli poravnavo IdeR vezavnih mest in njihovih okolic v *mbt* operonih in pred bakterioferitinskim genom, med MAH, MAA in različnimi tipi MAP. Razlike v IdeR vezavnih regijah smo ugotovili med genoma *mbtA* in *mbtB*, pred genom *mbtL* ter pred genom *bfrA*. V IdeR vezavni regiji mbtK in mbtI pomembnejših razlik nismo ugotovili (Priloga E).

Razlike v IdeR vezavnih mestih med *mbtA* in *mbtB*

Čeprav smo na Sliki 28 med *mbtA* in *mbtB* označili dve IdeR mesti, je dokazana vezava IdeR samo na mesto 1 (IdeR box 1), ki ima 73,7 % identiteto (in 78,9 % na komplementarni verigi) s konsenzom TTAGGTTAGGCTAACCTAA. Mesto 2 smo vključili, ker je bila podobnost tik pod mejo tolerance (68,4 %) za *in silico* identifikacijo vezavnih mest (73,7 %, Gold in sod. 2001) kar bi lahko imelo pomembno vlogo v regulaciji. Iz slike 4.4.2 je razvidno, da na IdeR mestu 2 ni razlik v zaporedju med podvrstami in tipi, medtem ko na IdeR mestu 1 najdemo substitucijo C/G na mestu 13 pri ovčjem tipu III (sev S397) in delecijo prvih dveh nukleotidov pri MAA, gledano v smeri *mbtB*. MAA ima sicer v smeri *mbtA* še več SNP-jev in delecij. Razen pri ovčjem tipu III so zaporedja celotne regije identična med tipi MAP in MAH (MAV104 na Sliki 28).

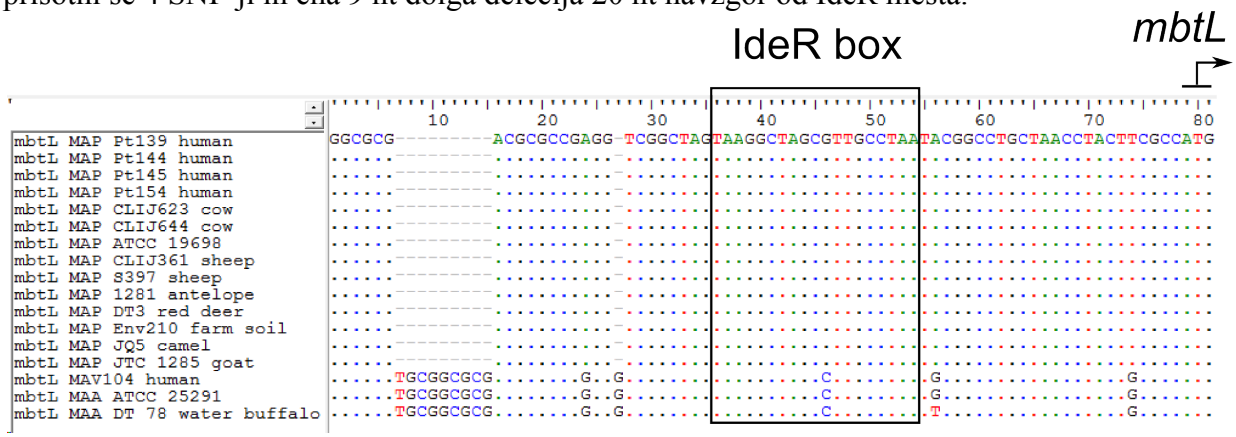


Slika 28: Poravnava IdeR vezavnih mest med *mbtA* in *mbtB* pri različnih podvrstah bakterije *M. avium* in tipih MAP IdeR vezavna mesta so prikazana v okvirjih. S puščicami so označeni start kodoni *mbtA* in *mbtB*.

Figure 28: Alignment of IdeR binding boxes between *mbtA* and *mbtB* from different *M. avium* subspecies IdeR binding boxes are shown in rectangles. Arrows represent start codons of *mbtA* and *mbtB*.

Razlike v IdeR vezavnih mestih pred *mbtL*

IdeR mesto v promotorju *mbtL* je identično pri vseh MAP tipih, od MAA in MAH se razlikuje po substituciji G/C na 11 mestu od začetka vezavnega mesta v smeri *mbtL* pri MAH in MAA (Slika 29). Zaradi tega ima to IdeR mesto pri MAP slabše ujemanje (68,4%) s konsenzom kot MAH/MAA (73,7%). Pri MAH in MAA so v neposredni okolic prisotni še 4 SNP-ji in ena 9 nt dolga delecija 20 nt navzgor od IdeR mesta.



Slika 29: Poravnava IdeR vezavnih mest v promotorju *mbtL* pri različnih podvrstah bakterije *M. avium* in tipih MAP

IdeR vezavno mesto je prikazano v okvirju. S puščicami je označen start kodon za *mbtL*.

Figure 29: Alignment of IdeR binding boxes in the promoter region of *mbtL* from different *M. avium* subspecies

IdeR binding boxes are shown in rectangles. Arrow represents start codon of *mbtL*.

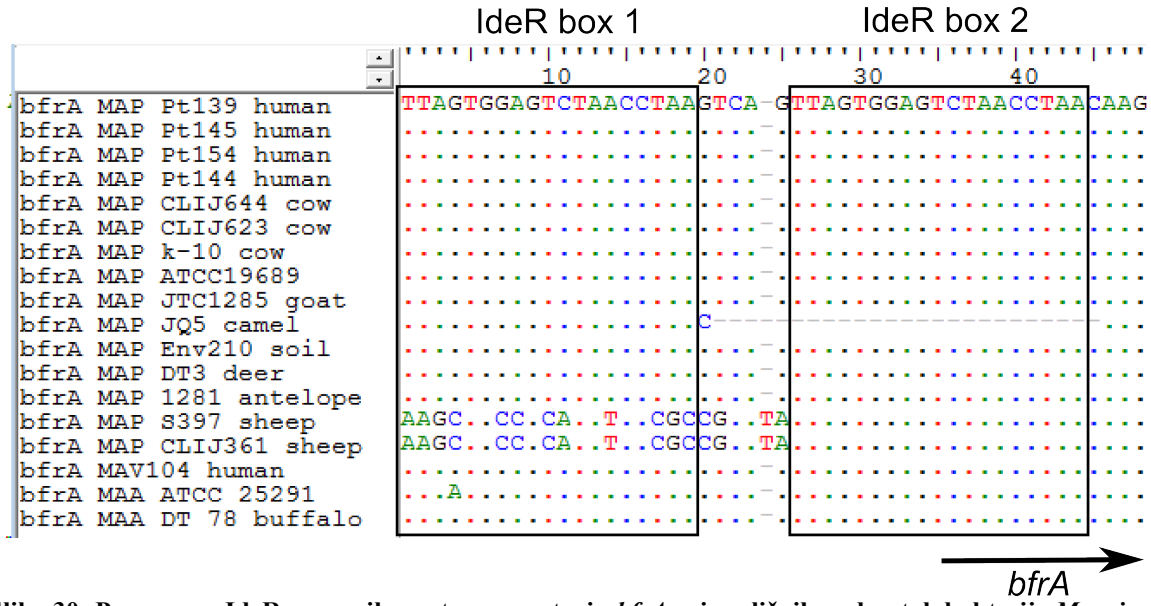
Razlike v IdeR vezavnih mestih pred *bfrA*

Med IdeR vezavnimi mesti pred genom *bfrA* obstaja znatna razlika. Ovčji sevi (oba tipa) imajo popolnoma drugačno zaporedje na mestu 1 kot goveji sevi MAP tipa II, MAA in MAH. IdeR mesto pri ovčjih sevih ima le 36,8 % ujemanje s konsenzom, medtem ko ujemanje pri sevih tipa II in MAH 78,9 %, pri MAA ATCC 25291 pa zaradi substitucije G/A na 4. mestu 73,4 %. Mesto 2 je popolnoma ohranjeno pri vseh podvrstah in tipih, razen pri MAP sevu JQ5, kjer je v celoti odsotno zaradi 25 nt dolge delecije (Slika 30).

Glede na filogenijo celotnih *bfrA* genov se MAP in MAH razvrščata v skupno evolucijsko enoto, MAA pa v ločeno (Priloga E). Aminokislinsko zaporedje predvidenega ORF pri MAP k-10 (goveji tip II) in MAH 104 je 100 % identično (Priloga E).

Razlike v zaporedju *ideR*

Nukleotidno zaporedje *ideR* gena razvrsti podvrste v tri filogenetske skupine (Slika 31). V prvi so MAP govejega tipa II, v drugi so ovčji sevi (tip I in III) ter MAH 104, sevi MAA pa predstavljajo 3. skupino. Na ravni aminokislinskega zaporedja je IdeR zelo ohranjen in se pri vseh primerjanih genomih razlikuje le v aminokislini na mestu 91. Pri ovčjih sevih MAP, MAA in MAH je na tem mestu glicin, pri MAP tipa II pa arginin (Priloga E).

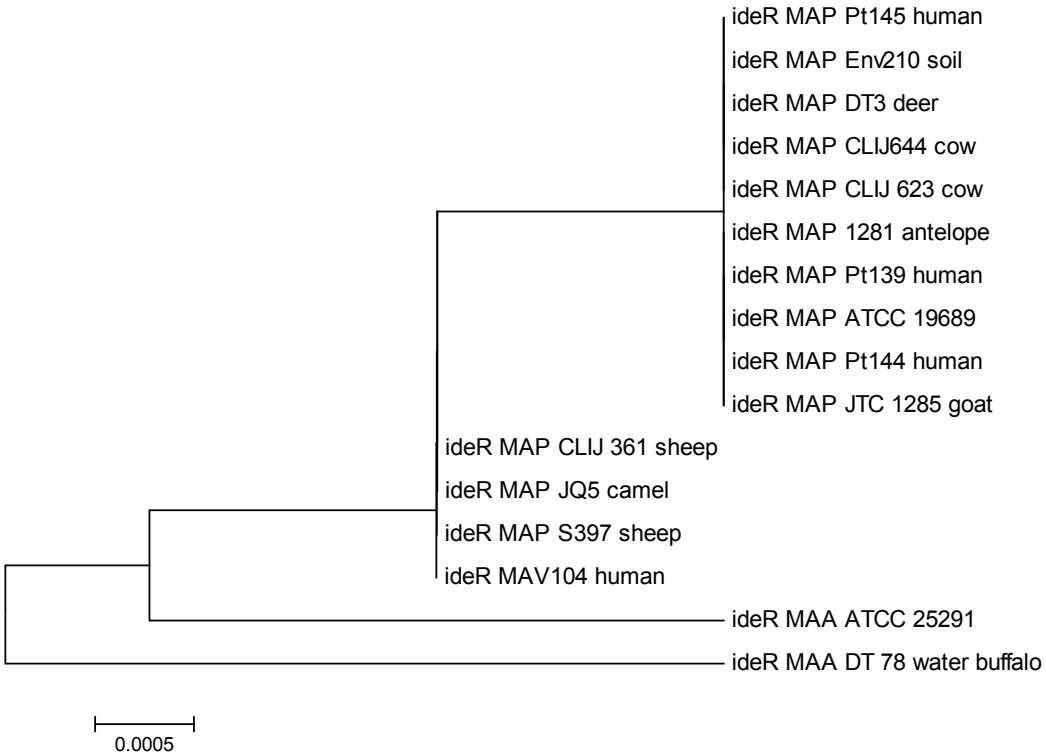


Slika 30: Poravnava IdeR vezavnih mest v promotorju *bfrA* pri različnih podvrstah bakterije *M. avium* in tipih MAP

IdeR vezavni mesti sta prikazani v okvirjih. Predviden start kodon ni prikazan, ker je preveč oddaljen od obeh IdeR mest. Puščica kaže smer nahajanja ORF za *bfrA*.

Figure 30: Alignment of IdeR binding boxes in the promoter region of *bfrA* from different *M. avium* subspecies

IdeR binding boxes are shown in rectangles. Predicted start codon of *bfrA* is too far to be included in the figure. Arrow shows the direction and position of *bfrA* ORF.



Slika 31: Filogenija *ideR* gena pri podvrstah bakterije *M. avium* in tipih MAP

Figure 31: Phillogeny of *ideR* from different *M. avium* subspecies

4.5 ANALIZA IZRAŽANJA *mbt* OPERONOV

4.5.1 Preliminarni poskus – preverjanje izražanja posameznih genov *mbt* operonov pri MAH 104 in MAP 468/09

V preliminarnih poskusih smo želeli preveriti aktivnost in raven transkriptov posameznih genov *mbt* operonov in nekaterih drugih genov, povezanih s pridobivanjem železa. V nadaljevanju smo se osredotočili le na izražanje genov neposredno za IdeR regulatornimi mesti.

Pri obeh bakterijah smo zaznali transkripte vseh analiziranih *mbt* genov (Slika 32). Za gen *mbtF* izražanja nismo določili, saj smo ga zaradi težav s specifiko pomnoževanja izločili iz analize. Pri večini genov smo zaznali povišanje števila kopij 24 ur po izpostavitvi gojišču brez železa, kar ni nujno posledica odziva operonov na pomanjkanje železa, saj v tem poskusu nismo analizirali vzporedne kontrole v gojišču z železom, na katero bi normirali izražanje v gojišču brez železa.

Primerjava ravni transkriptov posameznih *mbt* genov

Število kopij večine *mbt* genov pri MAP 468/09 je bilo po 24 urah precej višje (od 4 do 1000-krat) od števila kopij pri MAH 104. Izjeme so bile geni *mbtJ*, *mbtA* in *mbtG*, ki so bili na podobni ravni kot pri MAH 104. Izmed vseh genov smo najnižje ravni transkriptov (po 24 urah) pri MAH 104 opazili pri *mbtE* in *mbtL*. Pri teh dveh genih ter *mbtM* in *mbtN* je bila tudi največja razlika v izražanju med MAH in MAP po 24 urah (64-krat in 1000-krat višje pri MAP). Najnižje ravni transkriptov po 24 urah pri MAP 468/09 smo zaznali pri *mbtA*, *mbtJ* (Slika 32)

Primerjava ravni transkriptov genov, neposredno ob IdeR regulatorni regiji

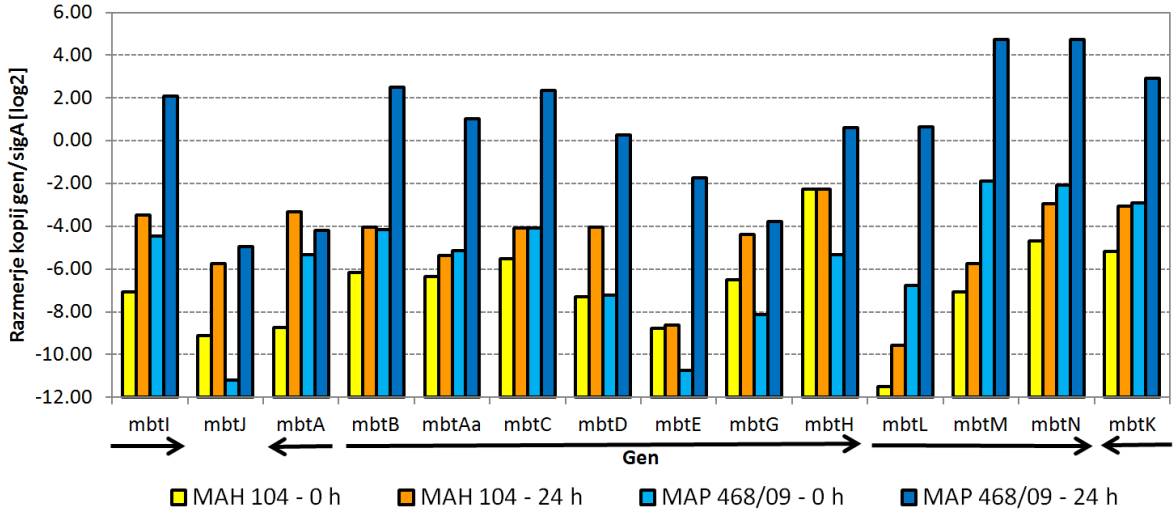
Za večino genov pri MAH 104, ki ležijo neposredno ob IdeR regiji, torej prvih v vrsti za transkripcijo (*mbtABIKL*), je bilo izražanje po 24 urah zelo podobno (*mbtABIK*), nekoliko nižje (približno 8-krat) je bilo le pri *mbtL* (Slika 32)

Tudi pri MAP 468/09 je bilo po 24 urah izražanje genov, neposredno za IdeR vezavnim mestom, na podobni ravni, z izjemo *mbtA*, ki je kazal približno 8-krat nižjo raven transkriptov (Slika 32).

Primerjava polarnosti transkripcije

Daljši transkripcijski enoti predstavljajo geni od *mbtB-H* (7 genov) in *mbtL-N* (3 geni). Pri MAH 104 pri transkripcijski enoti *mbtB-H* po 24 urah ni bilo videti polarnega efekta zniževanja ravni transkriptov z oddaljevanjem od promotorskega mesta vse do *mbtE*, ko se je raven transkriptov znižala za 4-krat, nato pa spet narasla na osnovno raven pri *mbtG* in se celo povišala za faktor 2 pri *mbtH*. V transkripcijski enoti *mbtL-mbtN* smo videli nasproten efekt, raven transkriptov se je povečevala z oddaljevanjem od promotorja (4-krat za mbtM in 8-krat za mbtN). Za gen *mbtJ* ni znano, v katero transkripcijsko enoto spada, raven transkriptov pa je bila približno 2-krat nižja od *mbtABIK* in v območju *mbtM* (Slika 32).

Pri MAP 468/09 je operon *mbtB-H* je kazal polarni efekt do gena *mbtG*, nato se je raven transkriptov pri *mbtH* dvignila na raven *mbtE*. Podobno kot pri MAH 104, smo pri MAP 468/09 opazili nasproten efekt naraščanja količine transkripta od mbtL do mbtN (Slika 32).

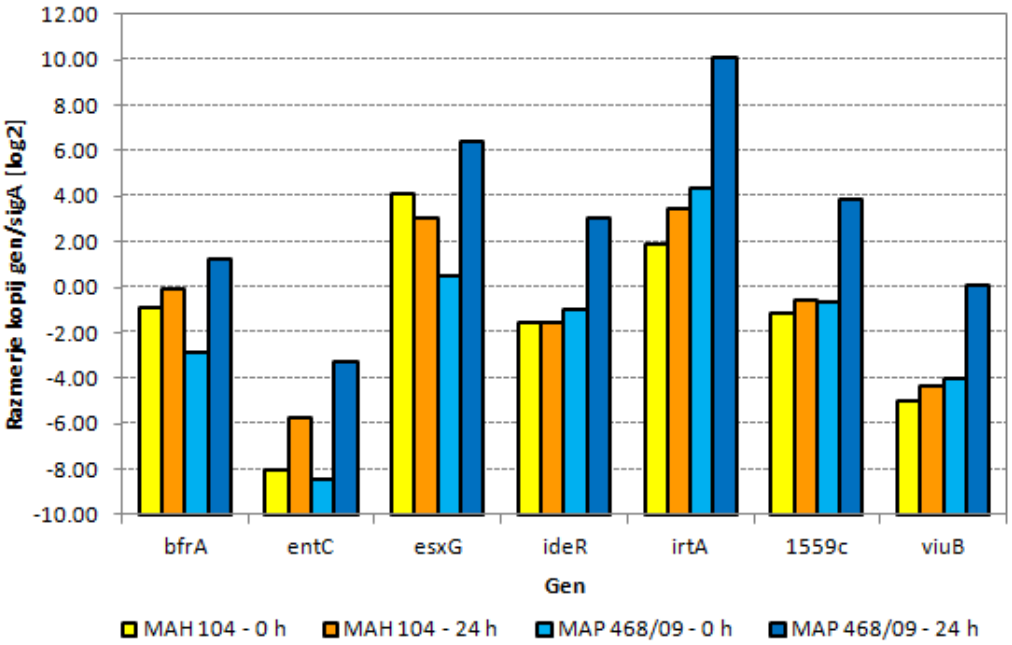


Slika 32: Izražanje genov *mbt* operonov pri MAH 104 in MAP 468/09
Vrstni red genov na grafu ustreza vrstnemu redu v genomu MAH 104 in MAP k-10. Oznaka *mbtAa* predstavlja gen *MAP2176c*. Razmerja so prikazana v dvojiških logaritmih. Pri vrednosti 0 na grafu je št. kopij gena enaki številu kopij hišnemu genu sigA. Izvedli smo le preliminarni poskus, brez ponovitev, zato standardni odklon ni prikazan.

Figure 32: Expression of genes of *mbt* operons in MAH 104 and MAP 468/09
Gene order corresponds to the order in the genome of MAH 104 and MAP k-10. Gene name *mbtAa* stands for gene *MAP2176c*. Ratios are shown in logarithms with a base of 2. A value of 0 means that the copy number of a *mbt* gene was equal to copy number of housekeeping gene *sigA*. Preliminary experiment was performed only once, therefore standard deviation is not shown.

Ravni transkriptov drugih genov, vpletenih v privzem železa

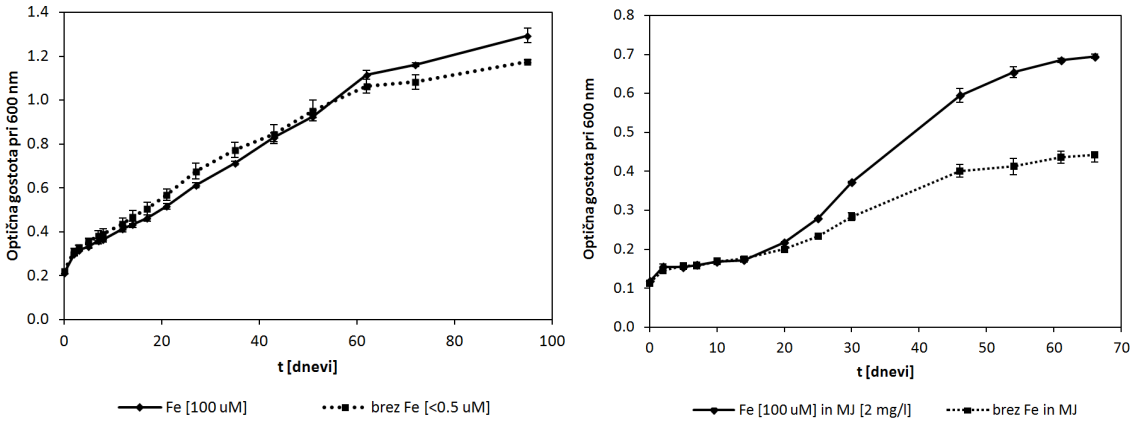
Pri analizi drugih genov, ki so domnevno vpleteni v privzem železa, smo prav tako zaznali izražanje vseh genov (Slika 33). Raven transkriptov za večino genov se je med obema bakterijama minimalno razlikovala ob času 0 (razlika v rangu faktorja 2). Po 24 urah so bile ravni transkriptov za večino genov višje pri MAP 468/09 kot pri MAH 104. Najmanjšo razliko smo opazili pri ravni transkriptov *bfrA* (bakterioferitin). Pri drugih genih so bile ravni transkriptov po 24 urah od 2 do 8-krat višje pri MAP 468/09 kot pri MAH 104. Pri obeh bakterijah je imel izmed vseh analiziranih genov najnižjo raven transkriptov gen *entC* (sinteza salicilata/izokorizmata), sledil je *viuB* (domnevni mikobaktin utilizacijski protein), nato *bfrA*, *ideR* in *1559c* (transkripcijski faktor pod IdeR kontrolo), ki sta imeli podobno raven transkriptov. Najvišjo raven transkriptov pri obeh mikobakterijah smo zaznali pri *esxG* in *irtA* (domnevno vpleten v transport mikobaktina).



Slika 33: Izražanje drugih genov domnevno povezanih s privzemom železa pri MAH 104 in MAP 468/09 Izvedli smo le preliminarni poskus, brez ponovitev, zato standardni odklon ni prikazan.
Figure 33: Expression of other genes predictably involved in acquisition of iron in MAH 104 and MAP 468/09 Preliminary experiment was performed only once, therefore standard deviation is not shown.

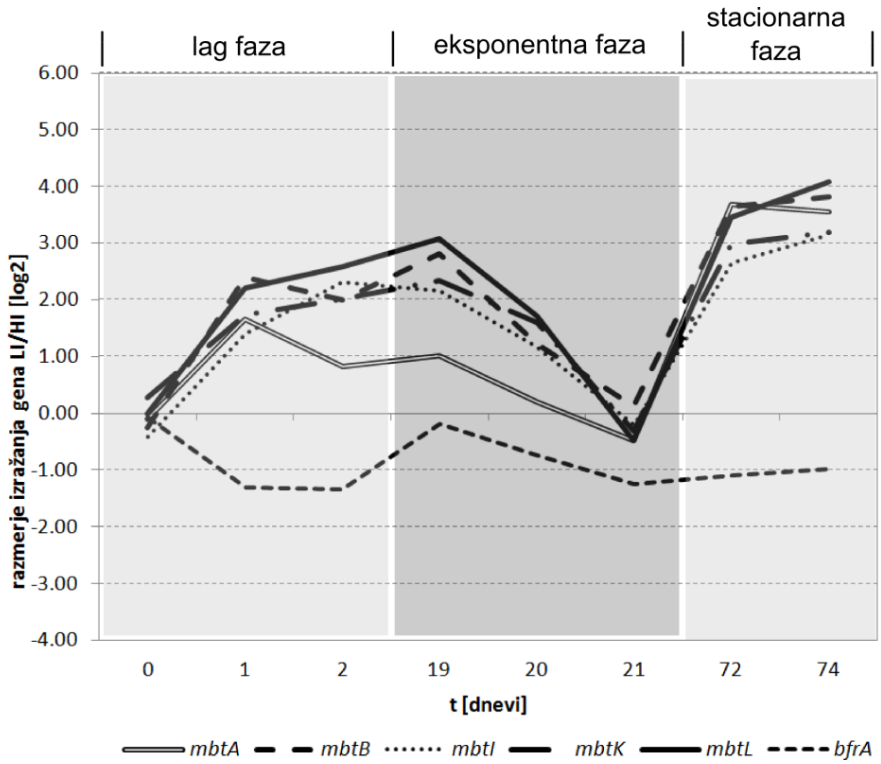
4.5.2 Odvisnost izražanja *mbt* genov od faze rasti in prisotnosti železa pri MAH 104 in MAP CLIJ623

MAH 104 in MAP CLIJ623 smo izpostavili pogojem pomanjkanja železa ter spremljali rast in izražanje genov v primerjavi z rastjo obeh bakterij v gojišču z normalno koncentracijo železa. Po pričakovanju pomanjkanje železa ni imelo večjega vpliva na kinetiko rasti MAH 104, kultura je dosegla za 9,1 % nižjo optično gostoto (OD) v stacionarni fazi, kot kultura ki je rasla v gojišču z železom. V obeh gojiščih kultura MAH 104 ni kazala tipične lag faze, temveč so bakterije kazale podobno kinetiko rasti kot v eksponentni fazi (Slika 34). Pomanjkanje železa je imelo precej večji efekt na rast MAP CLIJ623. V obeh gojiščih je bila vidna okoli 20 dni trajajoča lag faza, kateri je sledila eksponentna faza, z 2-krat večjim naklonom v gojišču z železom (k=0,0140/dan) kot v gojišču brez železa (k=0,0077/dan). Večja je bila tudi razlika v OD v stacionarni fazi rasti, kar za 36,3 % nižja kot v gojišču z železom (Slika 34).



Slika 34*:* Rastna krivulja za MAH 104 in MAP CLIJ623 v gojišču brez in z železom
Levo – MAH 104; *Desno* – MAP CLIJ623. Prikazan je standardni odklon treh paralelnih poskusov.
Figure 34: Growth curve of MAH 104 and MAP CLIJ623 in media with and without iron
Left – MAH 104; *Right* – MAP CLIJ623. Error bars represent standard deviation of 3 parallel experiments.

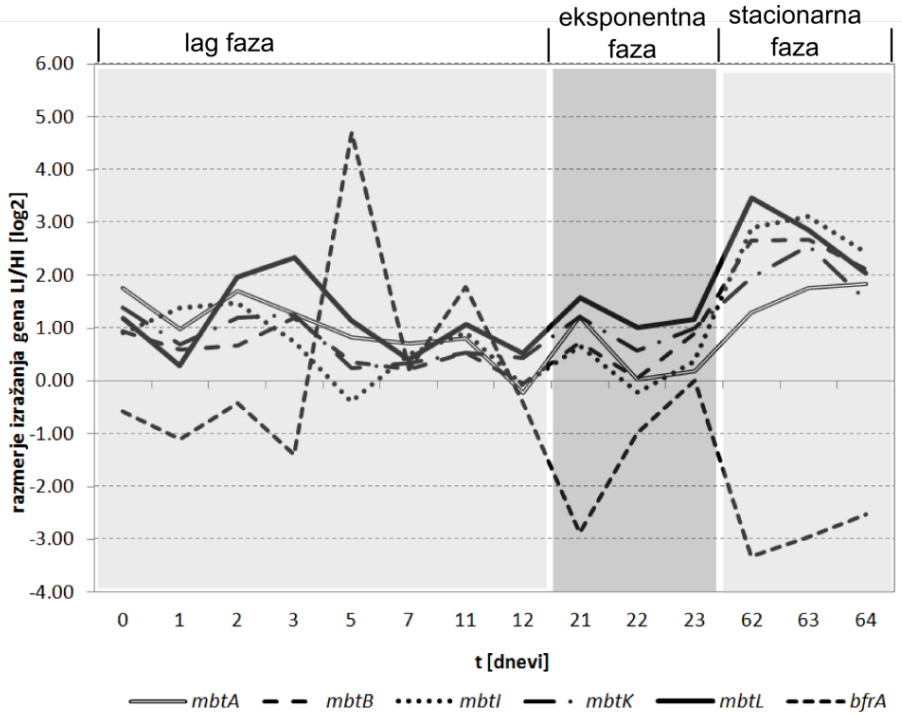
Pri obeh bakterijah smo zaznali transkripte vseh analiziranih genov: *mbtA*, *mbtB*, *mbtI*, *mbtK*, *mbtL* in *bfrA*. Za normalizacijo izražanja smo sprva hoteli uporabiti hišna gena *secA* in *sigA*, kasneje smo zaradi velikega nihanja izražanja *secA* izključili in uporabljali za normalizacijio le *sigA*. Po normalizaciji vseh genov na *sigA*, smo preračunali razmerja izražanja v gojišču brez (LI, *ang.* low iron) proti izražanju v gojišču z železom (HI, *ang.* high iron). Pri MAH 104 smo opazili usklajeno povišanje izražanja vseh *mbt* genov že v prvih 2 dneh od izpostavitve pomanjkanju železa. V zgodnji eksponentni fazi smo ob treh zaporednih časih vzorčenja (19., 20 in 21. dan) zaznali zelo variabilen nivo izražanja *mbt* genov, največje in konsistentno izražanje smo zaznali v stacionarni fazi. Izražanje *bfrA* je bilo nižje v LI kot v HI pogojih skozi vse faze rasti (Slika 35). Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije je pokazal visoko pozitivno korelacijo med izražanjem vseh analiziranih *mbt* genov (ρ=0,857-1,000, $p<0,01$, glej Prilogo F), medtem ko izražanje *bfrA* ni kazalo nikakršne korelacije z izražanjem *mbt* genov ($p>0,05$).



Slika 35: Razmerje izražanja genov pri MAH 104 v mediju brez (LI) in z železom (HI) po fazah rasti Prikazani so dvojiški logaritmi povprečnih vrednosti dveh neodvisnih poskusov. Zaradi preglednosti napake niso prikazane.

Figure 35: Ratio of gene expression for MAH 104 in low (LI) and high iron (HI) conditions across growth phases Shown are logarithms (base 2) of average values of two independent experiments. For better clarity, deviations are omitted.

Pri MAP CLIJ623 nismo zaznali povišanja izražanja *mbt* genov v prvih parih dneh kot pri MAH 104. Izražanje je sicer bilo nekoliko višje v LI kot v HI pogojih (a še vedno nižje kot pri MAH 104), vendar se ni bistveno spreminjalo, temveč je nihalo skozi celotno lag in eksponentno fazo rasti. Razmerje v izražanju *mbt* genov je poraslo šele v stacionarni fazi. Kot pri MAH 104 torej, je bilo tudi pri MAP CLIJ623 najvišje izražanje *mbt* genov v stacionarni fazi. Izražanje gena *bfrA* je precej nihalo. V zgodnji lag fazi je bilo izražanje v glavnem nižje v LI kot v HI pogojih. V pozni lag fazi je bilo izražanje *bfrA* v LI višje kot v HI, nato je ponovno padlo in v stacionarni fazi doseglo minimum (Slika 36). Izražanje vseh analiziranih *mbt* genov je pozitivno koreliralo, vendar so bili koeficienti korelacije nižji (ρ=0,666-0,916, $p<0,05$, glej Prilogo F) in so precej bolj variirali od gena do gena kot v primeru MAH 104. Izražanje *bfrA* je kazalo negativno korelacijo z izražanjem *mbt* genov ($p<0,05$), še najbolj z geni *mbtBIKL*, nekoliko manj z *mbtA* (Priloga F).



Slika 36. Razmerje izražanja genov pri MAP CLIJ623 v gojišču brez (LI) in z železom (HI) po fazah rasti Prikazani dvojiški logaritmi povprečnih vrednosti dveh neodvisnih poskusov. Zaradi preglednosti standardni odklon ni prikazan.
Figure 36: Ratio of gene expression for MAP CLIJ623 in low (LI) and high iron (HI) conditions across growth phases Shown are logarithms (base 2) of average values of two independent experiments. For better clarity, deviations are omitted.

4.5.3 Primerjava izražanja *mbt* genov med MAH 104 in MAP CLIJ623

Poleg primerjave globalnega trenda izražanja genov *mbt* operonov in gena *bfrA* smo želeli preveriti ali obstaja razlika v ravneh transkriptov posameznih genov napram hišnemu genu *sigA* in ali med obema bakterijama obstajajo razlike v razmerju med posameznimi geni ter odzivnosti v gojišču brez železa.

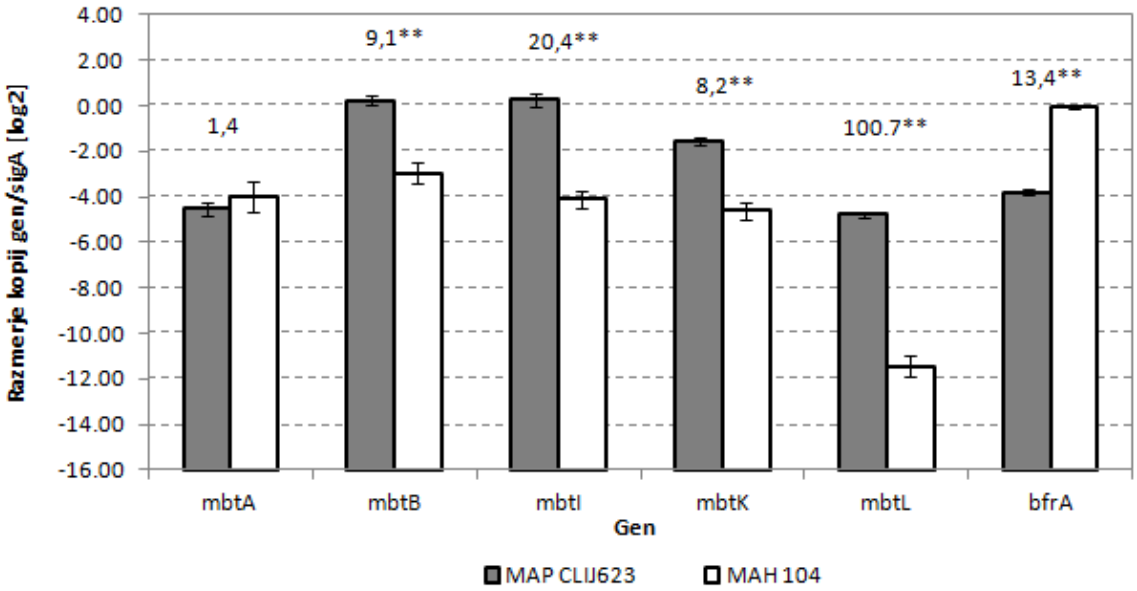
Glede na to, da smo pri obeh mikobakterijah zaznali najvišje in najbolj stabilno izražanje *mbt* genov v stacionarni fazi v pogojih brez železa, smo za analizo razlik v izražanju uporabili le to fazo (za primerjavo izražanja v ostalih fazah in pogojih glej Prilogo G).

Primerjava ravni transkriptov

Iz slike 37 je razvidno, da so bila razmerja za *mbtB*, *mbtI*, *mbtK* in *mbtL* precej višja pri MAP CLIJ623 kot pri MAH 104 ($p<0,001$). Izjema je *mbtA*, za katerega se razmerje med MAH in MAP ni bistveno razlikovalo ($p>0,05$), ter *bfrA,* ki je ravno nasprotno kazal 13,4-krat višje razmerje v MAH 104 kot v MAP CLIJ623.

Če primerjamo razmerja transkriptov posameznih genov med seboj, znotraj vrste bakterije, vidimo, da je pri MAH 104 po številu kopij v primerjavi z *sigA* največ transkriptov *bfrA* ($p<0,05$), in sicer približno 16-krat več kot transkriptov *mbtA*, *mbtB*, *mbtI* in *mbtK*. Raven slednjih se pri MAH 104 ni bistveno razlikovala ($p>0,05$). Število kopij *mbtL* proti *sigA* je bilo pri MAH 104 izjemno nizko in je bilo tudi pri kvantifikaciji blizu meje detekcije. Število kopij *mbtA*, *mbtB*, *mbtI* in *mbtK* je bilo približno 250-krat višje ($p<0,01$), število *bfrA* pa približno 2000-krat višje kot število kopij *mbtL* ($p<0,001$) (Slika 37).

Pri MAP CLIJ623 je bilo razmerje transkriptov drugačno kot pri MAH 104. Izmed analiziranih genov je bilo največ transkriptov gena *mbtB* in mbtI. Po številu transkriptov so sledili *mbtK* (4-krat manj) ter *mbtA, mbtL* in *bfrA* (16-krat manj) ($p<0,01$).



Slika 37: Primerjava ravni transkriptov analiziranih genov v stacionarni fazi med MAH 104 in MAP CLIJ623 v gojišču brez železa

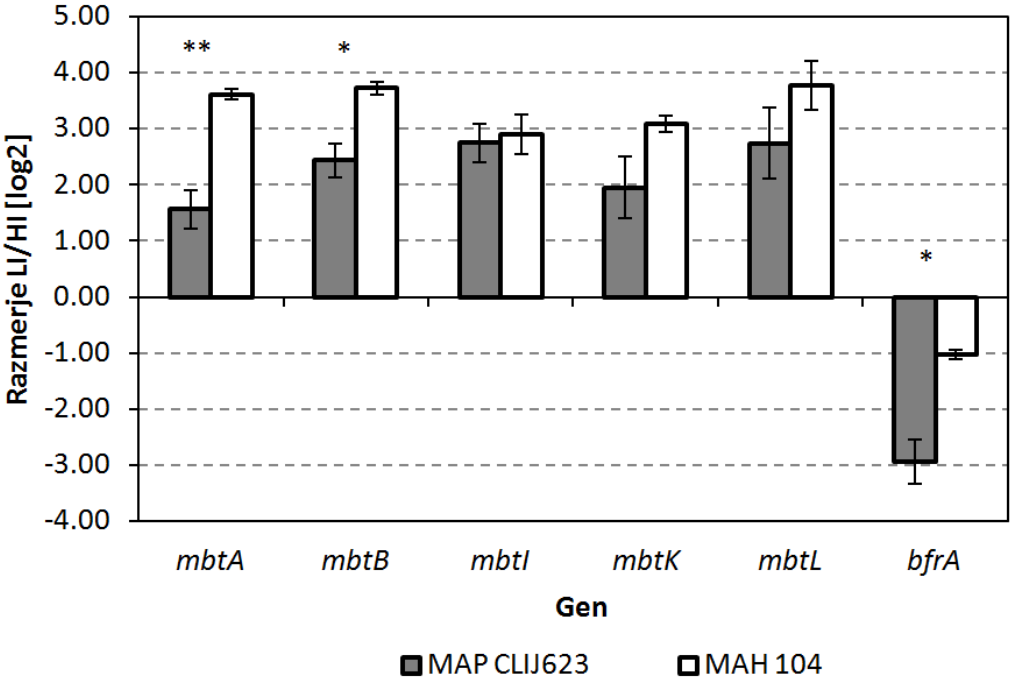
Prikazane so normalizirane ravni transkriptov (na *sigA*) v logaritemski skali z dvojiško osnovo. Nad stolpci so podani faktorji razlike med MAH in MAP, asterisk označuje statistično pomembnost (*t*-test) pri $p<0,005$.

Figure 37: Comparison of transcript levels for analysed genes in the stationary growth phase between MAH 104 and MAP CLIJ623 in medium without iron

Shown are normalized levels of transcripts (to *sigA*) in logarithms with base 2. Values above bars denote factor of difference between MAH and MAP. Asterisks indicate statistical significance (*t*-test) at $p<0,005$.

Izračunali smo tudi razmerje med izražanjem posameznih genov v gojišču brez in z železom v stacionarni fazi in ta razmerja primerjali med MAH 104 in MAP CLIJ623 (Slika 38). Iz rezultatov je razvidno, da je bilo v gojišču brez železa povišanje izražanja *mbtA* in *mbtB* pri MAH 104 približno 4-krat in 2,5-krat večje kot pri MAP CLIJ623. Povišanje je bilo nekoliko večje tudi v primeru izražanja *mbtK* in *mbtL*, vendar zaradi velikega odklona pod mejo statistične pomembnosti pri $\alpha=0,05$ ($p=0,075$ in $p=0,145$). Razliko smo zaznali tudi v primeru *bfrA*, kjer se je izražanje v gojišču brez železa pri MAP CLIJ623 znižalo približno 4-krat bolj kot pri MAH 104 ($p=0,008$). Razlike v razmerju za *mbtI* nismo zaznali.

Iz iste slike lahko tudi vidimo, da je bilo povišanje izražanja večine *mbt* genov v gojišču brez železa pri MAH 104 statistično podobno ($p>0,05$). Izjema je bil *mbtK*, ki je v primerjavi z *mbtA* in *mbtB* kazal nekoliko manjše povišanje izražanja ($p=0,048$ in $p=0,041$) in *mbtI* ki ni kazal statistične pomembnosti ($p>0,05$). Pri MAP CLIJ623 povišanje izražanja v gojišču brez železa ni bilo tako enotno. Izražanje *mbtB*, *mbtI* in *mbtL* je bilo 2 do 3-krat bolj povišano kot izražanje *mbtA* in *mbtK* ($p<0,05$).



Slika 38: Primerjava razmerij med izražanjem posameznih genov v pogojih brez (LI) in z železom (HI) pri MAH 104 in MAP CLIJ623 v stacionarni fazi rasti
Prikazani so dvojiški logaritmi povprečnih vrednosti dveh neodvisnih poskusov. Z asteriski so označene statistično pomembne razlike v razmerjih med MAH 104 in MAP CLIJ623; (**) – p<0,005, (*) – p<0,05.
Figure 38: Comparison of ratios of gene expression in low (LI) and high iron (HI) conditions for MAH 104 and MAP CLIJ623 in the stationary phase of growth
Shown are logarithms (base 2) of average values of two independent experiments. Asterisk indicate statistical significance in difference between MAH and MAP (*t*-test): (**) – *p*<0,005; (*) – *p*<0,05.

4.6 ODPORNOST NA ANTIBIOTIKE V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE ŽELEZA V GOJIŠČU

4.6.1 Spremembe v odpornosti na antibiotike pri bakteriji MAH 104

Glede na to, da je homeostaza železa vitalnega pomena za normalno funkcioniranje celice, nas je zanimalo, kako pomanjkanje železa vpliva na odpornost na antibiotike, katerih baktericidno delovanje je tesno povezano z indukcijo oksidativnega stresa v celici. Še zlasti nas je zanimalo, kako pomanjkanje železa s tega vidika vpliva na MAP, ki ne proizvaja sideroforov za privzem železa, pri čemer je vprašanje, kakšna je sploh sposobnost vzdrževanja homeostaze.

V primeru MAH104 smo uspeli določiti minimalne inhibitorne vrednosti (MIC) za 7 od 12 antibiotikov. MIC vrednosti za oksacilin, etambutol, 6-merkaptopurin, 4-aminosalicilat in salicilat nismo določili, ker so bile višje od testiranega koncentracijskega območja (testirali smo do maksimalnih koncentracij, ki jih lahko dosežemo pri terapiji s posameznim antibiotikom). Statistično pomembno spremembo (p<0,05) v MIC v odziv na koncentracijo železa smo zaznali pri štirih izmed sedmih antibiotikov, za katere smo lahko določili MIC (Preglednica 14). MIC za rifampicin je bila 4-krat in za D-cikloserin 2-krat nižja tako v $[Fe]_-$ kot v $[Fe]_\Delta$ pogojih v primerjavi z $[Fe]_+$ pogoji. MIC isoniazida je bila 4-krat nižja v $[Fe]_-$ pogojih in 2-krat nižja v $[Fe]_\Delta$ pogojih v primerjavi z $[Fe]_+$ pogoji. MIC za

azitromicin je bila vsaj 2-krat višja za celice, ki so rasle v $[Fe]_{\Delta}$ pogojih v primerjavi z $[Fe]_{+}$ pogoji, medtem ko med $[Fe]_{-}$ in $[Fe]_{+}$ pogoji nismo opazili razlik v MIC. Opažene razlike v MIC za rifampicin, D-cikloserin, isoniazid in azitromicin so bile očitne tudi iz inhibicijskih profilov (Slika 39c, i, a, h). MIC vrednosti za levofloksacin, streptomicin in 3-nitropropionsko kislino se niso bistveno razlikovale v odvisnosti od koncentracije železa ($p>0,05$, Preglednica14), vendar so bile razlike vidne iz inhibicijskih profilov (Slika 39f, g, l). To pomeni, da so bile razlike manjše od faktorja 2, kolikor je tudi bila ločljivost določevanja MIC v našem eksperimentu. Te razlike so bile ponovljive v vsaj treh neodvisnih poskusih, in sicer smo zaznali, da je bila MAH 104 manj občutljiva na levofloksacin in streptomicin v $[Fe]_{-}$ kot v $[Fe]_{\Delta}$ pogojih kot v $[Fe]_{+}$ pogojih (Slika 39f in g). Ravno nasprotno smo opazili pri 3-nitropropionski kislini, vendar le pri koncentracijah > 100 mg/l (Slika 39l).

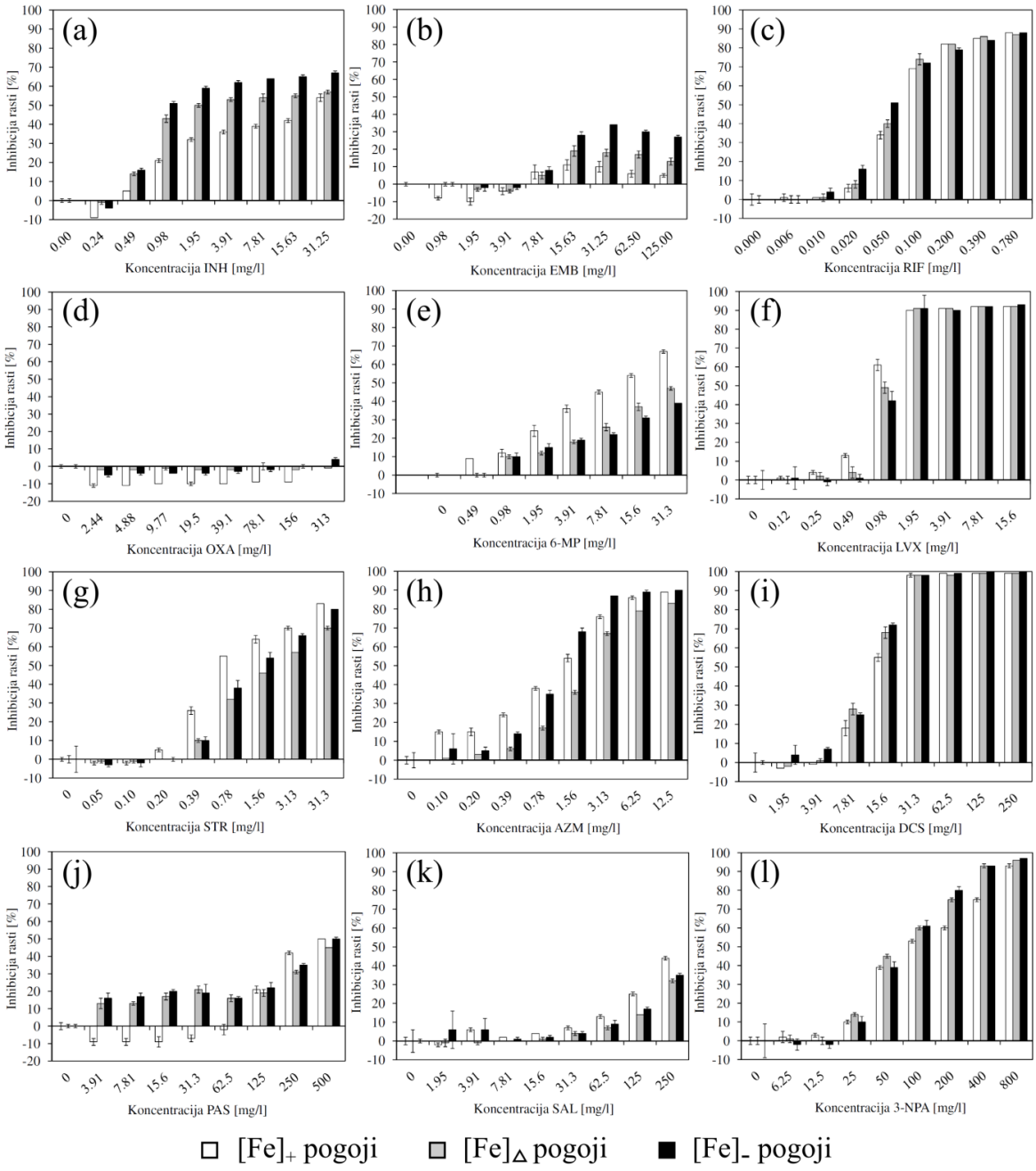
Preglednica 14: MIC vrednosti testiranih antibiotikov v $[Fe]_{+}$, $[Fe]_{\Delta}$ and $[Fe]_{-}$ pogojih za *M. avium* ssp. *hominissuis*, sev 104

Table 14: MIC values of tested antibiotics in $[Fe]_{+}$, $[Fe]_{\Delta}$ and $[Fe]_{-}$ conditions for *M. avium* ssp. *hominissuis*, strain 104

	MIC[b] [mg/l]					
	$[Fe]_{+}$ pogoji		*$[Fe]_{\Delta}$ pogoji*		*$[Fe]_{-}$ pogoji*	
Antibiotik[a]	*mediana*	*razpon*	*mediana*	*razpon*	*mediana*	*razpon*
INH	7,83	7,83-15,6	3,91*	1,96-3,91	1,96*	1,96
OXA	>312,5	>312,5	>312,5	>312,5	>312,5	>312,5
RIF	0,78	0,20-0,78	0,20*	0,10-0,20	0,20*	0,10-0,39
STR	1,56	1,56-3,13	3,13	0,78-3,13	1,56	0,78-1,56
6-MP	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5
AZM	3,13	3,13-6,25	>6,25*	6,25->6,25	3,13	3,13-6,25
PAS	>500	>500	>500	>500	>500	>500
EMB	>250	>250	>250	>250	>250	>250
LVX	1,98	1,98	1,98	1,98	1,98	1,98
DCS	62,5	62,5	31,3*	31,3-62,5	31,3*	31,3-62,5
3-NPA	400	400	400	400	400	400
SAL	>500	>500	>500	>500	>500	>500

[a] INH, isoniazid; OXA, oksacilin; RIF, rifampicin; STR, streptomicin; 6-MP, 6-merkaptopurin; AZM, azitromicin; PAS, 4-aminosalicilat; EMB, etambutol; LVX, levofloksacin; DCS, D-cikloserin; 3-NPA, 3-nitropropionska kislina; SAL, salicilat,

[b] prikazane so mediane in razponi MIC vrednosti, ki smo jih dobili v vsaj treh neodvisnih ponovitvah poskusa, MIC vrednosti v nekaterih poskusih so bile višje od testiranega območja, v takšnih primerih so mediane in razponi prikazani kot "večje kot" (">"); statistično značilne razlike ($p<0,05$, Studentov t-test) v MIC vrednostih med $[Fe]_{-}$ in $[Fe]_{\Delta}$ v primerjavi s $[Fe]_{+}$ pogoji so označene z asteriskom (*).



Slika 39: Profili inhibicije rasti MAH 104

$[Fe]_+$ - normalna dostopnost železa; $[Fe]_\Delta$ – »akutno« pomanjkanje železa; $[Fe]_-$ - nizka dostopnost železa. (a) INH, isoniazid; (b) EMB, etambutol; (c) RIF, rifampicin; (d) OXA, oksacilin; (e) 6-MP, 6-merkaptopurin; (f) LVX, levofloksacin; (g) STR, streptomicin; (h) AZM, azitromicin; (i) DCS, D-cikloserin; (j) PAS, 4-aminosalicilat; (k) SAL, salicilat; (l) 3-NPA, 3-nitropropionska kislina. Napake predstavljajo standardno deviacijo trikratnih meritev. Prikazan je en reprezentativen poskus.

Figure 39: Growth inhibition profiles for MAH 104

$[Fe]_+$ - normal iron conditions; $[Fe]_\Delta$ – »acute« low iron conditions; $[Fe]_-$ - low iron conditions. Error bars represent standard deviation of triplicate measurments. One representative experiment is shown.

Inhibicijski profili so nam omogočili določiti tudi razlike v občutljivosti na antibiotike, za katere nismo mogli določiti MIC. Oksacilin ni kazal inhibicije rasti pri nobeni koncentraciji železa v celotnem koncentracijskem območju, temveč je rast celo spodbujal, kar je bilo najbolj izrazito v $[Fe]_+$ pogojih (Slika 39d). Celice, ki so rasle v $[Fe]_-$ in $[Fe]_\Delta$ pogojih so bile bolj občutljive na etambutol in manj občutljive na 6-merkaptopurin kot v $[Fe]_+$ pogojih. 4-aminosalicilat je inhibiral MAH 104 samo v $[Fe]_-$ in $[Fe]_\Delta$ pogojih, pri višjih koncentracijah (>62,5 mg/l) pa je bila inhibicija primerljiva v vseh pogojih. Salicilat, ki običajno ni kategoriziran kot antibiotik, vendar je pri mikobakterijah prekurzor mikobaktina, je bil bolje toleriran v $[Fe]_-$ in $[Fe]_\Delta$ kot v $[Fe]_+$ pogojih.

4.6.2 Spremembe v odpornosti na antibiotike pri bakteriji MAP 468/09

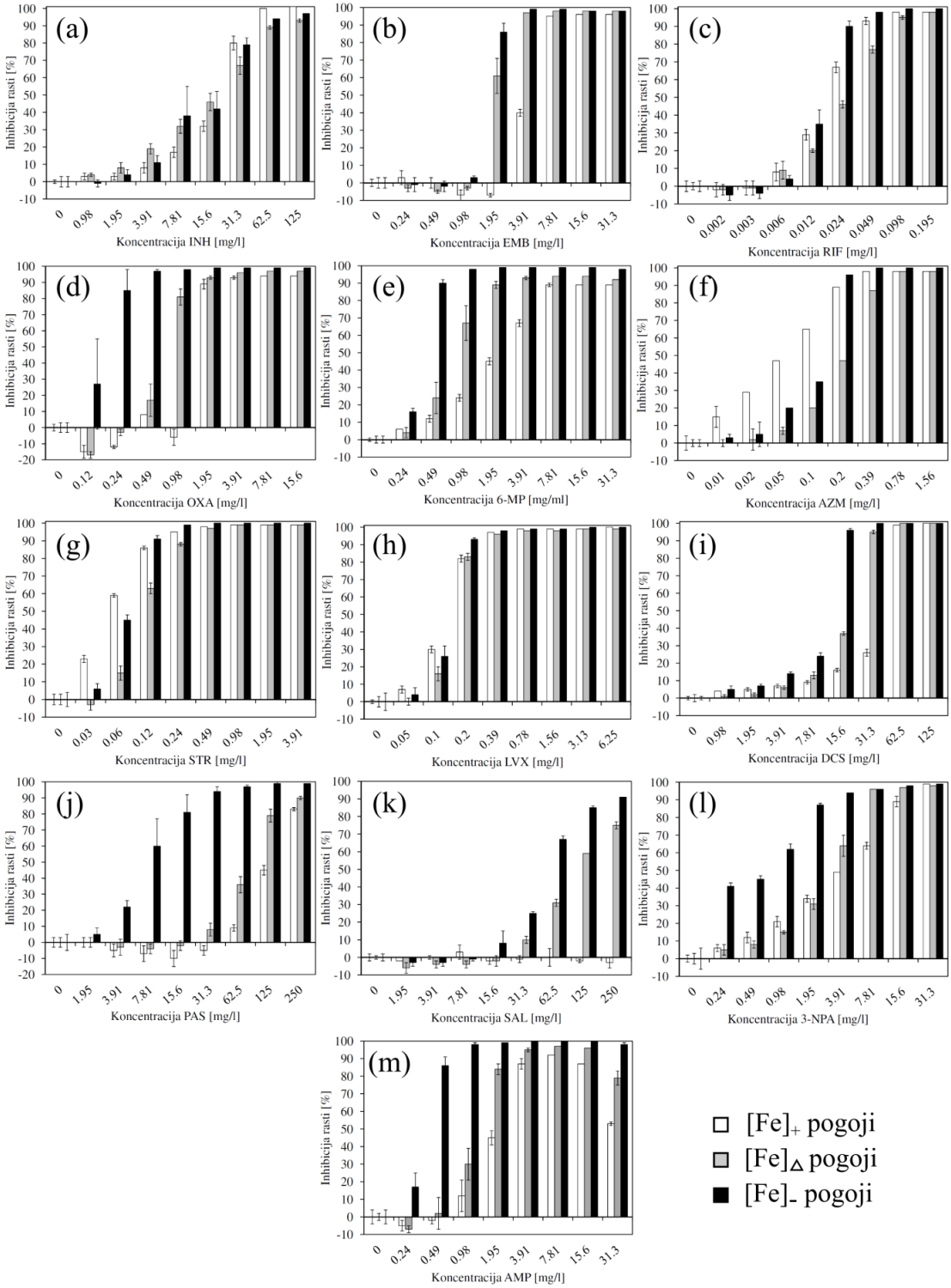
MAP 468/09 je bila v primerjavi z MAH 104 precej bolj občutljiva na večino antibiotikov (z izjemo isoniazida) zato smo lahko v testiranem koncentracijskem območju določili MIC vrednosti v vseh pogojih dostopnosti železa za 12 od 13 antibiotikov. MIC vrednosti nismo mogli določiti le za salicilat v $[Fe]_+$ pogojih.

Statistično pomembno ($p<0,05$) spremembo MIC v odziv na koncentracijo železa smo zaznali kar za 9 od 12 antibiotikov (Preglednica 15). Za vse te je vidna tudi razlika v občutljivosti iz inhibicijskih profilov na Sliki 6.4.2. Največjo razliko v MIC smo zaznali v primeru 4-aminosalicilata. MAP 468/09 je bila v $[Fe]_-$ pogojih kar 32-krat in v $[Fe]_\Delta$ pogojih 2-krat bolj občutljiva na 4-aminosalicilat kot v $[Fe]_+$ pogojih. MIC za oksacilin in etambutol je bila 8-krat nižja v $[Fe]_-$ in 4-krat nižja v $[Fe]_\Delta$ kot v $[Fe]_+$ pogojih. MIC za 6-merkaptopurin in 3-nitropropionsko kislino je bila 8-krat nižja, za levofloksacin pa 2-krat nižja v $[Fe]_-$ kot v $[Fe]_+$ pogojih. MIC za D-cikloserin je bila 2-krat nižja, tako v $[Fe]_\Delta$ kot v $[Fe]_-$ pogojih, v primerjavi s $[Fe]_+$ pogoji. MIC za oba testirana aminoglikozida, streptomicin in azitromicin, je bila 2-krat višja v $[Fe]_\Delta$ pogojih v primerjavi z $[Fe]_-$ in $[Fe]_+$ pogoji, kjer se MIC nista razlikovali. Razlik v MIC med različnimi koncentracijami železa nismo opazili za isoniazid, ampicilin in rifampicin. Za slednjega je nekoliko nižja inhibicija v $[Fe]_\Delta$ v primerjavi $[Fe]_-$ kot v $[Fe]_+$ pogojih vidna iz inhibicijskega profila (Slika 40c), vendar razlika v MIC ni dosegla statistične pomembnosti ($p>0,05$) in je verjetno manjša od faktorja 2, kolikor je bila ločljivost naše metode določevanja MIC. V primeru salicilata razlike v MIC nismo mogli določiti, ker je bila MIC v $[Fe]_+$ pogojih nad testiranim koncentracijskim območjem (>250 mg/l). Uspeli smo določiti MIC v $[Fe]_\Delta$ (250 mg/l) in $[Fe]_-$ (62,5 mg/l). To pomeni, da je bila občutljivost MAP 468/09 v teh pogojih višja kot v $[Fe]_+$ pogojih, kar je dobro vidno tudi iz inhibicijskih profilov (Slika 40k).

Preglednica 15: MIC vrednosti testiranih antibiotikov v $[Fe]_+$, $[Fe]_\Delta$ and $[Fe]_-$ pogojih za *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, sev 468/09
Table 15: MIC values of tested antibiotics in $[Fe]_+$, $[Fe]_\Delta$ and $[Fe]_-$ conditions for *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, strain 468/09

	MIC[b] [µg/ml]					
	$[Fe]_+$ pogoji		*$[Fe]_\Delta$ pogoji*		*$[Fe]_-$ pogoji*	
Antibiotik[a]	*mediana*	*razpon*	*mediana*	*razpon*	*mediana*	*razpon*
INH	31,3	31,3	31.3	31,3-62,5	31,3	31,3
OXA	3,91	1,95-3,91	0,98*	0,49-0,98	0,49*	0,24-0,98
RIF	0,037	0,006-0,098	0,030	0,012-0,049	0,024	0,012-0,049
STR	0,12	0,12	0,24*	0,24	0,12	0,12
6-MP	3,91	1,95-7,81	1,95	0,49-1,95	0,49*	0,49-0,98
AZM	0,20	0,10-0,20	0,39*	0,39	0,20	0,20-0,39
PAS[c]	250	>15,6-250	125	>15,6-125	7,81*	0,98-15.6
EMB	7,81	3,91-7,81	1,95*	1,95	0,98*	0,49-1,95
LVX	0,44	0,39-0,49	0,44	0,20-0,50	0,22*	0,20-0,24
DCS	46,9	31,3-62,5	23,4*	15,6-31,3	11,7*	7,81-15,6
3-NPA	23,4	15,6-31,3	11,7	7,81-15,6	2,93*	1,95-3,91
SAL[d]	>250	>250	250	>125	62,5	62,5
AMP	1,95	0,98-3,91	0,98	0,98-1,95	0,49	0,49

[a] INH, isoniazid; OXA, oksacilin; RIF, rifampicin; STR, streptomicin; 6-MP, 6-merkaptopurin; AZM, azitromicin; PAS, 4-aminosalicilat; EMB, etambutol; LVX, levofloksacin; DCS, D-cikloserin; 3-NPA, 3-nitropropionska kislina; AMP, ampicilin.
[b] prikazane so mediane in razponi MIC vrednosti, ki smo jih dobili v vsaj treh neodvisnih ponovitvah poskusa. MIC vrednosti v nekaterih poskusih so bile višje od testiranega območja, v takšnih primerih so mediane in razponi prikazani kot "večje kot" (">"); statistično značilne razlike ($p<0,05$, Studentov t-test) v MIC vrednostih med $[Fe]_-$ in $[Fe]_\Delta$ v primerjavi s $[Fe]_+$ pogoji so označene z asteriskom (*).
[c] Prikazane mediane MIC vrednosti v $[Fe]_+$ in $[Fe]_\Delta$ izvirajo iz enega samega poskusa, kjer smo izjemoma testirali zelo visoka koncentracijska območja antibiotika. V ostalih poskusih so bile MIC vrednosti v $[Fe]_+$ in $[Fe]_\Delta$ vedno višje od testiranega območja. Signifikanco smo v tem primeru izračunali s testom proporcev.
[d] Prikazane mediane MIC vrednosti v vseh pogojih izvirajo iz enega samega poskusa, kjer smo izjemoma testirali zelo visoka koncentracijska območja antibiotika. V ostalih poskusih so bile MIC vrednosti vedno višje od testiranega območja. Posledično nismo mogli izračunati statistične signifikance razlike v MIC.



Slika 40. Profili inhibicije rasti MAP 468/09

$[Fe]_+$ - normalna dostopnost železa; $[Fe]_\Delta$ – »akutno« pomanjkanje železa; $[Fe]_-$ - nizka dostopnost železa. (a) INH, isoniazid; (b) EMB, etambutol; (c) RIF, rifampicin; (d) OXA, oksacilin; (e) 6-MP, 6-merkaptopurin; (f) LVX, levofloksacin; (g) STR, streptomicin; (h) AZM, azitromicin; (i) DCS, D-cikloserin; (j) PAS, 4-aminosalicilat; (k) SAL, salicilat; (l) 3-NPA, 3-nitropropionska kislina; (m) AMP, ampicilin. Napake predstavljajo standardno deviacijo trikratnih meritev. Prikazan je en reprezentativen poskus.

Figure 40: Growth inhibition profiles for MAP 468/09

$[Fe]_+$ - normal iron conditions; $[Fe]_\Delta$ – »acute« low iron conditions; $[Fe]_-$ - low iron conditions. Error bars represent standard deviation of triplicate measurments. One representative experiment is shown.

4.6.3 Primerjava sprememb v odpornosti na antibiotike med bakterijama MAH 104 in MAP 468/09

Obe bakteriji sta v $[Fe]_-$ in $[Fe]_\Delta$ pogojih bolj občutljivi na oksacilin (v primeru MAH 104 se to kaže kot manjša indukcija rasti, glede na to, da oksacilin v vseh pogojih deluje stimulativno na rast), rifampicin, etambutol, D-cikloserin in 4-aminosalicilat. V primeru levofloksacina, 3-nitropropionske kisline, salicilata in 6-merkaptopurina smo povišano občutljivost v $[Fe]_-$ v primerjavi s $[Fe]_+$ zaznali le pri MAP 468/09, medtem ko pri MAH 104 za prva dva ni bilo razlike v občutljivosti, v primeru drugih dveh je bila občutljivost celo znižana v $[Fe]_-$ v primerjavi s $[Fe]_+$ pogoji. Občutljivost za isoniazid se je v $[Fe]_-$ v primerjavi s $[Fe]_+$ pogoji znižala le pri MAH 104, pri MAP 468/09 je ostala nespremenjena. Obe bakteriji sta kazali nižjo občutljivost na streptomicin in azitromicin v $[Fe]_\Delta$ pogojih v primerjavi z $[Fe]_-$ in $[Fe]_+$ pogoji (Preglednica 16).

Celokupno smo pri MAP 468/09 v $[Fe]_-$ pogojih v primerjavi z $[Fe]_+$ pogoji opazili povišano občutljivost za 9/13 (69 %) antibiotikov in nespremenjeno občutljivost za 4/13 (31 %) antibiotikov. Pri MAH 104 je bila občutljivost v $[Fe]_-$ pogojih v primerjavi s $[Fe]_+$ pogoji povišana za 6/12 (50 %) antibiotikov, nespremenjena za 4/12 (33 %) in znižana za 2 (17 %) antibiotika.

Preglednica 16: Primerjava sprememb v odpornosti na antibiotike pri MAP 468/09 in MAH 104 v odvisnosti od koncentracije železa
Table 16: Comparison of changes in susceptibility to antibiotics for MAH 104 and MAP 468/09 in response to iron concentration

	***Spremembe v odpornosti*[a]**			
	MAH 104		***MAP 468/09***	
Antibiotik	***$[Fe]_\Delta$***	***$[Fe]_-$***	***$[Fe]_\Delta$***	***$[Fe]_-$***
INH	↓ (2)*	↓ (4)*	=	=
OXA	↓*	↓*	↓ (4)*	↓ (8)*
RIF	↓ (4)*	↓ (4)*	↓ (1,2)	↓ (1,5)
STR	↑ (2)	=	↑ (2)*	=
6-MP	↑*	↑*	↓ (2)	↓ (8)*
AZM	↑ (2)*	=	↑ (2)*	=
PAS	↓*	↓*	↓ (2)	↓ (32)*
EMB	↓*	↓*	↓ (4)*	↓ (8)*
LVX	=	=	=	↓ (2)*
DCS	↓ (2)*	↓ (2)*	↓ (2)*	↓ (2)*
3-NPA	=	=	↓ (2)	↓ (8)*
SAL	↑*	↑*	↓*	↓*

[a] spremembe v odpornosti so podane kot spremembe v MIC relativno na MIC v $[Fe]_+$; (↓) - nižja MIC (manjša odpornost); (↑) - višja MIC (večja odpornost); (=) – ni spremembe; v oklepajih so večkratniki znižanja/povišanja MIC vrednosti; večkratniki niso podani v primerih, ko je bila razlika v odpornosti na antibiotike v odvisnosti od dostopnosti železa razvidna le iz inhibicijskih profilov, ne pa iz MIC vrednosti. Statistično značilne spremembe ($p<0,05$, Studentov t-test) v odpornosti med $[Fe]_-$ in $[Fe]_\Delta$ v primerjavi s $[Fe]_+$ pogoji so označene z asteriskom (*).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V naši raziskavi smo se osredotočili na privzem železa pri dveh sorodnih mikobakterijah, *Mycobacterium avium* podvrste *hominissuis* (MAH) in *paratuberculosis* (MAP). MAP za razliko od MAH, kljub izredni genetski sorodnosti, ne proizvaja sideroforov, s katerimi MAH in večina patogenih mikobakterij pridobiva železo v okoljih, kjer ga primanjkuje. V okviru naše raziskave smo zato želeli preveriti, kaj je vzrok za odsotnost mikobaktina pri bakterijah podvrste MAP, kako kljub temu preživijo dalj časa v okolju, izven gostitelja ter kako to vpliva na odpornost na antibiotike. Preverili smo ohranjenost operonov na genetski in transkripcijski ravni v primerjavi z bakterijami podvrste MAH in identificirati kritične razlike, ki bi lahko prispevale h okvari sinteze mikobaktina. Nadalje smo določili razširjenost in dinamiko bakterij podvrste MAP v okolju ter določili presek življenjskega okolja z drugimi podvrstami *M. avium* in amebami in navedli možnosti za perzistenco bakterij podvrste MAP v okolju. Nazadnje smo preverili, kako pomanjkanje železa vpliva na odpornost na antibiotike, še zlasti pri MAP, ki ima okvarjen sistem privzema železa z mikobaktinom, in to navezali na problematiko zdravljenja okužbe s tema dvema bakterijama

5.1.1 Primerjalna genomika in transkriptomika *mbt* operonov

5.1.1.1 Primerjalna genomika *mbt* operonov

Bolj obsežna primerjalna genomika na mikobaktinskih operonih med podvrstami bakterije *M. avium* zaenkrat še ni bila izvedena in večina ugibanj o vzroku za genetsko okvaro sinteze mikobaktina izhajajo iz primerjave zaporedij enega seva posamezne podvrste. Razlog je predvsem pomanjkanje dostopnih genomov v javnih bazah zaporedij, kar se v zadnjih letih pospešeno popravlja, predvsem na račun cenovno dostopnih metod sekveniranja nove generacije. Filogenetske analize so pokazale, da obstaja med različnimi skupinami bakterij podvrst MAP (v nadaljevanju samo MAP) precejšnja genetska raznolikost, zato so sklepanja na osnovi enega seva vsekakor prenagljena. V naši raziskavi smo prvič v primerjalno analizo zajeli več različnih tipov MAP, v primeru MAP tipa II celo več sevov, medtem ko sta v bazi zaporedij zaenkrat le po en sev ovčjega tipa I in tipa III. Zaporedja MAP smo nato primerjali z zaporedji bakterij podvrst MAA in MAH (v nadaljevanju samo MAH ali MAA), za katere je znano, da proizvajajo mikobaktin. MAA in MAH sta med mikobakterijami najbolj podobni MAP, zaradi česar je obstajala večja možnost za pravilno identifikacijo morebitnih kritičnih razlik v primerjavi z MAP.

Pokazali smo, da so mikobaktinski operoni pri MAA in MAH popolnoma ohranjeni, medtem ko smo pri MAP opazili veliko sprememb v odprtih bralnih okvirjih za posamezne predvidene gene *mbt* operonov. Spremembe smo opazili pri vseh tipih MAP, vendar so se pri različnih tipih pojavljale na različnih mestih oziroma so bile »okvare« v različnih genih. Če obstaja genetski razlog za okvaro v sintezi mikobaktina, potem bi težko rekli, da je skupen vsem tipom MAP. Li in sodelavci (2005) so po zaključku sekveniranja prvega genoma MAP sev k-10, opazili da je *mbtA* MAP k-10 skrajšan v primeru z *mbtA* MAH 104 (v bazi kot MAV 104) in *M. tuberculosis*, kar naj bi botrovalo okvari sinteze mikobaktina

pri MAP. Kasneje so Alexander in sodelavci (2009) pokazali, da je *mbtA* skrajšan zaradi genetskih preurejanj samo pri govejih tipih MAP, medtem ko pri ovčjih tipih ne. V naši raziskavi smo to potrdili in hkrati pokazali, da je to značilno za oba ovčja tipa(I in III).

Vsi analizirani goveji sevi MAP tipa II v naši študiji so imeli identično razporeditev in dolžino ORF v mikobaktinskem operonu. Razlike v primerjavi z MAH in MAA smo opazili za gene *mbtA*, *mbtE*, *mbtF* in *mbtL*. Gen *mbtA* je skrajšan in mu manjka zapis za C-terminalni del funkcionalnega proteina MbtA. Ta del naj bi vseboval vezavno mesto za ATP, ki je potrebna za aktivacijo salicilata in vezavo v ArCP domeno mbtB za nadaljnjo sintezo mikobaktina. Iz tega vidika je skrajšan *mbtA* vsekakor potencialen kandidat za moteno sintezo mikobaktina pri govejih sevih MAP. V primeru takšne okvare bi pričakovali kopičenje salicilata, ki vstopa v reakcijo z *mbtA*. Višek salicilata lahko vpliva na različne procese v celici, *M. tuberculosis* se na povišane zunanje koncentracije salicilata odziva s povišano odpornostjo na več antibiotikov (Schaller in sod., 2002). Za mikobakterije je sicer znano, da ob pomanjkanju železa znotraj celice kopičijo velike količine salicilata, izloča pa se tudi v okolico. Kopičenje salicilata zaradi okvare *mbtA* lahko dodatno prispeva k indukciji fenotipa, rezistentnega na antibiotike.

Gen *mbtE* je razcepljen na dva ORF pri vseh tipih MAP, zaradi česar bi lahko bil skupen razlog za okvaro v sintezi mikobaktina pri MAP. Gen je sicer različno razcepljen pri različnih tipih MAP, pri govejih tipih je krajši za 420 aminokislin (aa), pri obeh ovčjih pa za 488 aa v primerjavi z encimom MbtE pri MAA in MAH (2191 aa). Mehanizem encimske reakcije katalizirane z MbtE še ni natančno raziskan, zato tudi ni znano, ali skrajšan gen povzroči izgubo katalitskih mest, pomembnih za delovanje encima. Podobno je pri vseh podvrstah skrajšan tudi gen *mbtF*, pri govejih in ovčjih tipih I za 68 aa, medtem ko pri ovčjem tipu III za 554 aa. Tudi v tem primeru ni znan vpliv skrajšanja na katalitske funkcije encima, vsekakor obstaja večja možnost, da je *mbtF* nefunkcionalen pri ovčjih tipih III zaradi daljše manjkajoče C-terminalne regije encima. Tako nefunkcionalnost MbtE kot MbtF bi lahko povzročila okvaro v sintezi mikobaktina, saj oba sodelujeta pri sintezi jedra mikobaktina preko kondenzacije lizinskih aminokislinskih ostankov na rastočo verigo.

Pri govejih sevih MAP v primerjavi z MAH in MAA smo opazili tudi skrajšan *mbtK* za polovico, tokrat na N-terminalnem delu. Trenutno identificirani katalitski mesti, to sta mesto za vezavo substrata in akceptor protona, obe padeta v drugo polovico (Krithika in sod., 2006), kar nakazuje na možnost normalnega funkcioniranja encima, kljub skrajšanju. MbtK sicer sodeluje pri pripenjanju acilnih verig na ε-amino skupino lizina na jedru mikobaktina. To pomeni, da v primeru okvare tega encima ne bi prišlo do pripenjanja dolgih acilnih verig značilnih za hidrofobno, membransko sidrano varianto mikobaktina, kot je mikobaktin J. Zaenkrat še ni znano, v kateri fazi pride do karboksilacije/esterifikacije stranske verige, ki je značilna za vodotopno varianto mikobaktina, pred ali po pripenjanju acilne verige, niti se ne ve, kateri encimi so za to odgovorni. Zato je težko reči, ali bi okvara v MbtK vplivala na sintezo le ene variante mikobaktina ali na obe.

V ovčjem sevu tipa I, vendar ne v ovčjem sevu tipa III, smo opazili tudi razcepljenost *mbtI* na dva dela, približno na polovici, brez premika v bralnem okvirju. MbtI katalizira sintezo salicilata iz korizmata in izokorizmata, ki je prvi korak v sintezi mikobaktina (Zwahlen in sod., 2007). Okvara v sintezi prekurzorja za mikobaktin bi zato resno lahko ogrozila celotno sintezo mikobaktina in verjetno povzročila odsotnost kakršnihkoli sinteznih intermediatov v gojišču ob odzivu MAP na pomanjkanje železa. Mikobakterije imajo sicer

še druge gene, ki kodirajo za encime, ki sintetizirajo salicilat, kot sta *entD* in *entC* (Nagachar in Ratledge, 2010b). Homolog *entC* je prisoten tudi pri MAP, in bi teoretično lahko kompenziral okvaro MbtI, vendar je vprašanje, koliko prispeva k sintezi salicilata v pogojih pomanjkanja železa, saj ni pod neposredno kontrolo IdeR regulatorja (Yellaboina in sod., 2006). Obstaja tudi možnost, da funkcionalnost MbtI kljub razcepljenosti na dva dela ni okrnjena. Vsa do sedaj znana katalitska mesta so zajeta v drugem ORF, ki je v sicer v istem bralnem okvirju kot prvi del in ima enako aminokislinsko zaporedje kot C-terminalna polovica intaktnega MbtI pri drugih podvrstah (Harrison in sod., 2006). Ni pa znano, kako manjkajoči del vpliva na strukturo celotnega encima in ali vpliva na katalitsko aktivnost.

Manjšo razliko smo opazili tudi v zaporedju *mbtC*, vendar le pri ovčjih tipih. Gre za zgodnji stop kodon po 111 nt (33 aa) zaradi substitucije nukleotida, vendar se zaradi alternativnega start kodona na mestu 171 isti ORF nadaljuje, zaradi česar je zaporedje preostanka gena popolnoma ohranjeno. To kaže na majhno verjetnost vloge *mbtC* pri okvari sinteze mikobaktina pri ovčjih tipih MAP.

V *mbt-2* operonu smo pri ovčji sevih identificirali 2 razliki, ki bi lahko prispevali k spremenjeni sintezi mikobaktina. Ta operon zapisuje za encime, ki sodelujejo pri pripenjanju dolgih acilnih verig na stransko skupino mikobaktina. Pri obeh ovčjih sevih smo opazili skrajšan gen *mbtL*, ki zapisuje encim za desaturacijo acilnih verig. Pri večini mikobakterij so opazili, da se stranske verige nahajajo tako v nasičeni kot tudi v nenasičeni obliki, čeprav se ne ve kakšen je vpliv na afiniteto do železa ali kakršnokoli drugo funkcijo mikobaktina (Wong in sod., 1996). Iz tega razloga je malo verjetno, da bi okvara v *mbtL* lahko ključno prispevala k okvari sinteze mikobaktina pri ovčjih tipih MAP.

Gen *mbtM* pri ovčjih sevih MAP tipa III kaže dodatno razliko v *mbt-2* operonu v primerjavi z MAH in MAA. Gen je razcepljen na dva dela, večji (N-terminalni del MbtM) in manjši (C-terminalni del), zaradi substitucije in zgodnjega stop kodona, vendar sta oba dela v istem bralnem okvirju, brez razmika, zaporedje obeh pa identično zaporedju celotnega *mbtM* pri ostalih podvrstah. Katalitska mesta niso znana, zato tudi o porazdelitvi le teh med obema deloma težko govorimo, kot tudi o možnosti ohranjene funkcionalnosti. Dejstvo je, da MbtM ne sodeluje pri sintezi jedra mikobaktina in bi posledično morali zaznati pri MAP vsaj prisotnost karboksimikobaktina.

Poleg razlik v samih zaporedjih genov, je lahko razlog za okvaro v sintezi mikobaktina tudi spremenjena regulacija, kot posledica mutacij v regulatornih mestih. V okviru naše raziskave smo zato izvedli tudi poravnavo vseh zaznanih IdeR vezavnih mest v mikobaktinskih operonih. Kljub temu, da smo zaznali SNP-je pri različnih podvrstah in sevih v širši promotorski regiji, so bila IdeR vezavna mesta večinoma dobro ohranjena. Razlike smo opazili v IdeR vezavnem mestu med *mbtA* in *mbtB*, kjer sta se izolat MAP iz kamele in ovčji sev tipa III (S397) razlikovala od ostalih podvrst in sevov v enem SNP, ki ni spremenil odstotek ujemanja zaporedja s konsenzom IdeR vezavnega zaporedja. V nasprotju za Janagamo in sodelavci naši rezultati kažejo prisotnost SNP-jev le pri ovčjem tipu III in ne pri vseh ovčjih sevih. Pokazali so, da SNP ne vpliva na regulacijo z IdeR (Janagama in sod., 2009). Morda najbolj pomembna razlika, ki smo jo opazili, je bila v primerjavi IdeR regije pred *mbtL* genom. Opazili smo, da se SNP v IdeR vezavnem mestu na poziciji 11 pojavlja le v MAA in MAH podvrstah. V vseh MAP tipih je na tem mestu prisoten G namesto C, kar vpliva na znižanje ujemanja vezavnega zaporedja s konsenzom za IdeR iz 73,7 % pri MAA in MAH na 68,4 % pri MAP. Tako nizko ujemanje s konsenzom je premalo, da bi ga lahko klasificirali kot IdeR vezavno mesto. Če pri *in silico*

iskanju IdeR regij v genomu MAP postavimo prag podobnosti na 70 %, dobimo 20 zadetkov, medtem ko v primeru praga pri 68 % dobimo kar 65 zadetkov. Podobno so pokazali Gold in sodelavci, ki so ugotovili da pri ujemanju 13/19 nukleotidov (68,4 %) IdeR konsenza število zadetkov predvidenih IdeR motivov naraste na 100 v primerjavi 26. zadetki pri ujemanju 14/19 (73,4 %). Pri tako nizkem ujemanju kot je 68,4 % dobimo veliko lažnih IdeR vezavnih mest (Gold in sod., 2001). Slaba specifika IdeR mesta v promotorju *mbtL* pri MAP tako lahko dejansko pomeni spremenjeno regulacijo navzdolnjih genov (*mbtL*, *mbtM* in *mbtN*), ki bi lahko vplivala na sintezo mikobaktina. Možno je, da se IdeR zaradi tega slabše veže na promotor in se drugače odziva na koncentracije železa, npr. z disociacijo z DNK in indukcijo transkripcije že pri višjih koncentracijah železa. V primeru *mbtL* smo našli večje razlike tudi v širši promotorski regiji, pri čemer so se filogenetsko MAH in MAA lepo ločile od ostalih MAP sevov. Poleg 4 SNP-jev je bila za vse MAP značilna tudi 9 nt dolga delecija v -30 območju od začetka IdeR mesta, kar bi lahko posredno vplivalo na vezavo IdeR, preko konformacijskih sprememb v DNK.

Sam gen za IdeR je zelo ohranjen pri vseh podvrstah *M. avium*, le pri govejih sevih MAP tipa II smo opazili nesinonimno substitucijo, ki spremeni aminokislino 91 iz glicina v arginin, vendar zamenjava naj ne bi vplivala na regulatorne funkcije IdeR (Janagama in sod., 2009). Evolucijska ohranjenost *ideR* v primerjavi z geni *mbt* operonov kaže na pomembno vlogo tega regulatorja pri mikobakterijah, tudi MAP. Razlog za to je verjetno dejstvo, da IdeR poleg operonov za sintezo mikobaktina pri mikobakterijah regulira številne druge gene, pomembne za vzdrževanje homeostaze železa in obrambo pred oksidativnim stresom ter je nepogrešljiv za preživetje mikobakterij (Rodriguez in sod., 2002).

5.1.1.2 Transkriptomika *mbt* operonov

S transkripcijsko analizo *mbt* operonov smo želeli komplementirati analizo razlik na genetski ravni. Vendar povezava ni vedno neposredna. Okvara gena na genetski ravni ne pomeni nujno spremembe na transkripcijski ravni in obratno. Do sedaj so le redke raziskave analizirale ali poročale o transkripcijski aktivnosti *mbt* operonov pri MAP v pomanjkanju železa. Naši rezultati so pokazali, da so vsi geni *mbt* operona pri govejem izolatu MAP 468/09 transkripcijsko aktivni v pomanjkanju železa. Transkripcijsko aktivnost *mbtA*, *mbtB*, *mbtI*, *mbtK*, *mbtL* in *bfrA* smo dodatno potrdili še s transkripcijsko analizo na sevu MAP CLIJ623, ki spada med goveje tipa II. V obeh primerih smo za primerjavo analizirali tudi MAH 104, kjer smo prav tako z visoko ponovljivostjo zaznali transkripcijo z vseh genov.

V preliminarnih poskusih smo analizirali transkripcijo z vseh genov in jih primerjali med MAH 104 in MAP 468/09. Analizo smo izvedli samo v eni ponovitvi, v času 0 in 24 ur po izpostavitvi kultur pomanjkanja železa. Prav tako transkripcije nismo paralelno normirali na pogoje rasti v gojišču z železom, kar bi nam pokazalo, kakšno je dejansko diferencialno izražanje. Sprememba izražanja, zlasti na začetku, se lahko spreminja zaradi različnih faz rasti in ne kot specifičen odziv na pomanjkanje železa. Zato odzivnosti genov v tem poskusu nismo mogli komentirati, lahko pa smo določili, ali se geni izražajo in kakšne so ravni posameznih genov, normiranih na hišni gen *sigA*. Iz teh poskusov smo ugotovili, da so bile ravni večine genov *mbt*-operonov precej višje pri MAP 468/09 kot pri MAH 104, z izjemo *mbtA*, *mbtJ* in *mbtG*. Največje razlike smo zaznali v ravneh genov *mbtE* in *mbtL*, *mbtM* in *mbtN*.

V preliminarnih poskusih smo izvedli tudi analizo transkripcije drugih genov, ki so povezani s privzemom železa. Eden izmed njih je bil tudi gen za IdeR regulator, ki se je izražal pri obeh mikobakterijah. Med drugimi geni je bil tudi gen *entC*, kodira za alternativno salicilat sintazo. Gen *irtA* kodira za membranski transporter, ki naj bi sprejemal železo od mikobaktina za transport čez celično membrano (Rodriguez in Smith, 2006). Tudi *esxG*, del sekrecijskega sistema 7, naj bi bil vpleten v transport mikobaktina v celico, ne pa iz celice (Siegrist in sod., 2009). ViuB naj bi bil po homologiji iz *Vibrio sp.* vpleten v privzem železa iz siderofor v notranjosti celice, vendar so pred kratkim pokazali, da ni vpleten v metabolizem železa pri mikobakterijah (Santhanagopalan in Rodriguez, 2012). Gen 1559c naj bi bil homolog transkripcijskega regulatorja BlaI, ki vpliva na regulacijo beta-laktamaznih genov (Sala in sod., 2009). Vsi izmed naštetih, razen *entC*, so pod IdeR regulacijo in za vse smo pokazali, da so transkripcijsko aktivni tako v MAP 468/09 kot tudi v MAH 104.

V nadaljnjih poskusih smo primerjali izražanje genov *mbtABIKL* med MAH 104 in MAP623. Izražanje smo spremljali od dneva izpostavitve pomanjkanju železa do stacionarne faze. Pri obeh bakterijah je bil viden odziv na pomanjkanje železa že iz rastne krivulje. MAH 104 je dosegla nekoliko nižjo optično gostoto v stacionarni fazi v gojišču brez železa. MAP 623 je kljub odsotnosti mikobaktina rastla v gojišču brez železa, čeprav z 2-krat nižjim naklonom rastne krivulje. Verjetno smo kljub spiranju kultur, del mikobaktina prenesli v sveže gojišče brez železa in mikobaktina. Mikobaktin J, ki smo ga sicer običajno dodajali v gojišče, je hidrofobnega tipa, kar pomeni da se lokalizira v membranah MAP (Gobin in Horwitz, 1996). Ker smo uporabili precej velike inokulate (optična gostota okoli 0,2), je bilo mikobaktina očitno dovolj, da je MAP kljub temu rastla. To se je odražalo tudi na izražanju *mbt* operonov, saj smo pri MAP 623 v primerjavi z MAH 104 zaznali manjšo indukcijo transkripcije v lag fazi rasti. Pri obeh bakterijah smo zaznali maksimalen odziv *mbt* operonov v stacionarni fazi rasti. Ker je bilo železo že v začetku v pomanjkanju in najverjetneje omejujoč dejavnik rasti, so bakterije rastle dokler ga ni zmanjkalo, medtem ko so je v gojišču z železom rast ustavila kasneje, zaradi izčrpanja drugih nutrientov. Pri tem je pomembno poudariti, da gojišče ki smo ga uporabljali v poskusih kot »brez železa«, ni bilo popolnoma brez železa, temveč je bilo pod mejo detekcije metode, ki smo jo uporabljali za določevanje železa (>0,5 µM), kar je po literaturi že v območju indukcije *mbt* operonov pri mikobakterijah (Sritharan in sod., 2006). Obe bakteriji sta kazali povišano izražanje genov *mbt* operonov v odziv na pomanjkanje železa v stacionarni fazi, zato nas je zanimalo, ali obstajajo razlike med relativnimi (normiranimi na *sigA*) nivoji transkriptov. Podobno kot v preliminarnih poskusih z MAP 468/09, smo tudi pri MAP 623 ugotovili, da so nivoji transkriptov za *mbtB*, *mbtI*, *mbtK* in *mbtL* od 6- do 160-krat višji kot pri MAH 104, za *mbtA* razlik med bakterijama nismo opazili. Obstaja možnost, da smo razliko v nivojih transkriptov *mbt* operonov med MAP in MAH zaznali zaradi različnih nivojev transkriptov *sigA*, vendar bi v tem primeru pričakovali konstantne razlike pri vseh *mbt* genih, kar pa ni bilo res. Možno, da so višje ravni *mbt* genov pri MAP posledica in ne vzrok okvare sinteze mikobaktina. Zaradi pomanjkanja mikobaktina lahko MAP občuti večje pomanjkanje železa, kot MAH, kar vodi do povišanega izražanja *mbt* genov in višjih ravni transkriptov. Zanimivo je, da le za *mbtA* nismo opazili razlik v ravni transkriptov, in ravno *mbtA* je pri MAP 623 skrajšan, encim pa domnevno nefunkcionalen zaradi odsotnosti mesta za vezavo ATP. V sami regulatorni regiji (IdeR mesta) nismo opazili razlik med MAH in MAP. Predvidevamo, da mora biti *mbtA* dodatno reguliran, ločeno od mbtB. Razdalja med IdeR vezavnimi mestom in start kodonom *mbtA* je precej večja (okoli 70 nt) v primerjavi z *mbtB* (okoli 20). Zato obstaja možnost vezave dodatnih regulatorjev ali drugačnih interakcij z RNK polimerazo,

kot so to opazili na primeru *bfrA* (Gold in sod., 2001). Pri genetski analizi smo ugotovili tudi prisotnost sekundarnega vezavnega mesta za IdeR, bližje *mbtA* (~50 nt), s sicer nižjim pragom ujemanja s konsenzom (68,7 %). To bi lahko vplivalo na diferencialno izražanje tega gena. Nenazadnje ne moremo izključiti možnosti post-transkripcijske regulacije. Pokazali so, da je stabilnost mRNK več genov pri mikobakterijah dodatno regulirana z vezavo IRP proteinov (ang. iron regulatory proteins) na IRE elemente (*ang.* iron responsive elements), ki se nahajajo v 5' ali 3' neprevedenih regij genov (Banerjee in sod., 2007).

V nadaljevanju smo hoteli primerjati še odzivnost posameznih genov na pomanjkanje železa. Zato smo primerjali razmerja transkriptov v gojišču brez in z železom. Ker smo za analizo izbrali gene, ki so ležali tik ob promotorski regiji (*mbtABIKL*), smo na ta način primerjali tudi učinkovitost promotorjev. Pokazali smo, da je odziv *mbtA* in delno *mbtB* pri MAH 104 tudi do 4-krat višji kot pri MAP 623. Hkrati smo ugotovili, da je bil odziv vseh *mbt* genov pri MAH 104 približno enak – količina transkriptov je bila približno 9-krat višja v gojišču brez železa kot v gojišču z železom. Tudi pri MAP 623 je bil odziv večine genov enak, kar pa ni bilo res za gen *mbtA*, ki je ponovno izstopal in kazal približno 2-krat nižji odziv kot ostali geni (*mbtBIKL*) pri MAP 623. Gen *mbtA* si deli promotorsko regijo z *mbtB,* ta pa je kazal primerljiv odziv z ostalimi *mbt* geni direktno za promotorji v MAP 623. To pomeni, da mora biti *mbtA* drugače oziroma dodatno reguliran, kar je značilno le za MAP 623, podobno kot smo pazili pri primerjavi ravni transkriptov. Gen *mbtA* je zato možen kandidat za vlogo pri okvari sinteze mikobaktina pri govejih sevih MAP tipa II.

Zaznali smo tudi razliko v izražanju gena *bfrA*, ki kodira bakterioferitin in ima nalogo shranjevanja v pogojih izobilja železa. Tudi *bfrA* je pod kontrolo IdeR, le da ima zaradi kompleksnega promotorja IdeR ravno obraten vpliv na izražanje. Izražanje je relativno povišano, kadar je železa dovolj in relativno znižano, kadar ga primanjkuje (Rodriguez, 2006). To smo potrdili tudi v naših poskusih, kjer smo zaznali nižje izražanje *bfrA* v pogojih pomanjkanja železa. Zanimivo je bilo, da je bilo pri MAP 623 to znižanje 4-krat večje kot pri MAH 104. Promotorji *bfrA* med MAP 623 in MAH 104 se ne razlikujejo, zatorej lahko izključimo možnost razlik v regulaciji z IdeR. Pri primerjavi ravni transkriptov *bfrA* smo opazili 13-krat nižje vrednosti kot pri MAH 104. Ti rezultati podpirajo možnost, da MAP zaradi okvare v sintezi siderofor močneje občuti pomanjkanje železa.

V genetski analizi smo ugotovili večjo razliko v promotorskih regijah *mbtL*, ki je filogenetsko ločila med MAP sevi na eni strani ter MAH in MAA sevi na drugi strani. Velike razlike smo opazili tudi na transkripcijski ravni, pri čemer so bile ravni *mbtL* gena približno 60-krat nižje pri MAH kot pri MAP. Sevi MAP imajo v tem promotorju zaradi SNP IdeR vezavno mesto, ki je ne meji praga specifičnosti. Možna posledica bi bila slabša afiniteta IdeR za vezavo in spuščanje promotorja že pri višjih koncentracijah železa v primerjavi z MAH.

Skupno smo v transkripcijski analizi ugotovili, da se ravni transkriptov in odzivnost *mbt* genov in *bfrA* gena med analiziranimi MAP in MAH sevi razlikujejo, kar bi lahko vplivalo na spremenjen metabolizem mikobaktina in s tem privzem železa. Poleg tega so genetske analize v primerjavi z MAH in MAA pokazale več mutacij, ki bi lahko vplivale na funkcionalnost kodiranih sinteznih encimov. Te mutacije se razlikujejo med različnimi tipi MAP, zaradi česar morebitni vzrok za okvaro sinteze mikobaktina ni skupen vsem tipom MAP. Zanimivo je, da se *mbt*-operoni na nivoju nesinonimnih mutacij bolj razlikujejo med posameznimi tipi MAP, kot med podvrstama MAH in MAA, čeprav je evolucijska

razdalja med slednjima precej večja kot med tipi MAP (Turenne in sod., 2008). To pomeni, da se nesinonimne mutacije v *mbt* operonih MAP hitro kopičijo in tolerirajo, kar podpira možnost, da operon dejansko ni funkcionalen. Postavlja se vprašanje, zakaj MAP vzdržuje nefunkcionalen operon. Poleg tega smo v naši raziskavi dokazali, da se geni *mbt*-operona pri MAP izražajo. Izražanje genov, ki tvorijo nefunkcionalne encime je z energijskega vidika potratno za celico. Ohranjanje nefunkcionalnih genov v bakterijah je mogoč v primerih, da njihova prisotnost ni škodljiva za celico (Lawrence in sod., 2001). Iz tega vidika bi pričakovali, da se *mbt*-operon v življenjskem okolju MAP ne izraža. Iz tega sledi, da MAP v svojem življenjskem okolju ni izpostavljena pomanjkanju železa, saj bi v nasprotnem primeru bilo izražanje nefunkcionalnega *mbt*-operona energijsko zelo potratno za MAP. To pomeni, da obstajajo alternativni načini kako MAP pridobiva železo v gostitelju, kot tudi v okolju. Pri *M. tuberculosis* so pred kratkim karakterizirali gene, ki omogočajo privzem železa neposredno iz gostiteljevega hema (Tullius in sod., 2011). Homologe genov za privzem železa s hema smo identificirali tudi MAP.

Turenne in sodelavci so pokazali da v filogenetski skupini MAH najdemo precej manjši delež nesinonimnih polimorfizmov kot pri MAP, zaradi česar domnevajo, da je genom MAH evolucijsko starejši in bolj ustaljen. MAP se po drugi strani še razvija (Turenne in sod., 2008). Organizacija genomov MAP je tako lahko le trenutna slika na evolucijski poti MAP iz zelo fleksibilnega okoljskega organizma kot je MAH, v specializirani patogeni mikroorganizem. Takšna evolucija se kaže tudi v redukciji genoma, ki je vidna med MAH in MAP. Pri tem procesu se izgubljajo neesencialni geni, vendar primer *M. leprae* kaže, da je izguba le teh lahko počasna. *M. leprae* je močno specializiran obligatni patogen, a je kljub temu skoraj polovica vseh genov pseudogenov (nefunkcionalni ostanki genov), veliko od teh kaže tudi transkripcijsko aktivnost (Cole in sod., 2001; Nakamura in sod., 2009). Iz tega vidika lahko za vsak genom rečemo, da opazujemo le neko trenutno stanje v evoluciji, ki ni nujno optimizirana (Pallen in Wren, 2007). Za večino mikobakterij, ki so prevzele patogen način življenja (npr. *M. tuberculosis M. leprae, MAP*), je značilen izredno dolg generacijski čas, kar lahko odločno prispeva k počasni evoluciji genoma v smislu izgube nefunkcionalnih genov. Velikost genoma je odvisna od ravnotežja med insercijskimi in delecijskimi dogodki (Mira in sod., 2001). Pomemben faktor, ki vpliva na uvajanje novih koristnih genov v genom je horizontalni prenos genov. Po nekaterih hipotezah naj bi imeli intracelularni patogeni manjši stik z drugimi bakterijami (alopatrija) in posledično manjši fluks genskih insercij. S tem je pritisk na genom manjši, kar omogoča počasnejšo redukcijo genoma in poveča možnost, da se nefunkcionalni geni ohranjajo dalj časa v genomu (Lawrence in sod., 2001). Vendar za intracelularne patogene ni nujno vedno značilen alopatrični način življenja. Mnogi intracelularni patogeni so odporni tudi na fagocitozo ameb, kjer so podvrženi simpatriji, saj amebe požirajo velike količine bakterij iz različnih rodov, ki so ali niso odporne na fagocitozo, vsekakor pa prihajajo v stik z drugimi intracelularnimi bakterijami (Moliner in sod., 2010). Tudi v makrofagih je za mikobakterije značilno, da se fagosomi, v katerih se nahajajo, lahko zlivajo z drugimi endosomskimi vezikli, zaradi česar lahko prihajajo v stik z drugimi bakterijami ali bakterijsko DNK (Russell in sod., 1996). V tem primeru lahko tudi v primeru intracelularnih patogenov pričakujemo znatno frekvenco horizontalnega prenosa genov.

Naši rezultati kažejo, da *mbt* operoni pri podvrstah MAP vsebujejo številne degenerativne mutacije, prav tako obstajajo razlike v izražanju *mbt* genov v primerjavi z MAH. Zaradi tega funkcionalnost *mbt* proteinov najverjetneje ni ohranjena in posledično sinteza mikobaktina okvarjena. V nadaljevanju nas je zato zanimalo, kako MAP preživi v okolju, glede na to, da ni kompetentna z vidika pridobivanja železa.

5.1.2 Preživetje bakterij podvrste MAP v okolju

5.1.2.1 Razširjenost in dinamika bakterij podvrste MAP v okolju

Bakterije podvrste MAP so domnevno obligatni patogeni in niso sposobne razmnoževanja izven gostitelja, delno tudi na račun nezmožnosti produkcije lastnega mikobaktina. Zaradi tega naj bi bila razširjenost MAP v okolici kmetij vezana predvsem na kontaminacijo z okuženim fecesom živali. Količine MAP, ki jih okuženo govedo v tretjem in četrtem stadiju infekcije izloča v feces, so lahko zelo velike, tudi do 10^9 MAP/g. Zaradi tega lahko majhno število okuženega goveda, ki ni pravočasno izločeno iz črede, poglavitno prispeva h kontaminaciji okolja (Eisenberg in sod., 2010b). V našem primeru je bila večina zajetih vzorcev pozitivna za IS*900* oz. MAP, kar 79,3 % na kmetiji A in 69,0 % na kmetiji B, na obeh kmetijah so bile v čredi prisotne tudi krave, ki so izločale tudi po 10^8 MAP/g na kmetiji A in 10^9 MAP/g na kmetiji B (Priloga C). Kot so opazili v preteklih raziskavah (Eisenberg in sod., 2010a; Raizman in sod., 2004), smo tudi v naši raziskavi zaznali največ MAP pozitivnih vzorcev med vzorci, ki so bili pomešani s fecesom. To so bili kanali in bazeni odvajane gnojnice, tla skupnih hodnikov in staj, rezervoarji za hrambo in razvoz gnojnice ter deponije gnoja. Kontaminacija s fecesem okuženega goveda je bila najverjetneje razlog tudi za pozitivnost večine vzorcev iz poti goveda na pašo in tal okoli krmilnikov in napajalnikov na pašnikih. MAP smo zaznali tudi v naravnih vodnih virih na pašnih površinah, kar je najverjetneje posledica spiranja kontaminiranih površin, pri čemer se je inokulum močno razredčil. Koncentracije v vodnih virih v okolici kmetije A so bile vsaj 10^5-krat nižje kot v vzorcih, ki so vsebovali feces. Zaskrbljujoč rezultat z vidika širjenja okužbe, je kontaminacija vode iz napajalnikov na obeh kmetijah. Zgornji robovi napajalnikov so bili nižji od zadkov krav, zaradi česar obstaja možnost, da je do kontaminacije prišlo z naključno defekacijo v napajalno korito. Glede na volumen napajalnikov na kmetiji A in B (cca 750 l) bi en iztrebek krave (~2 kg), ki izloča velike količine MAP (~10^8 bakterij MAP/g fecesa), prispeval h kontaminaciji (v primeru homogene distribucije po vodni fazi) okoli 10^5 bakterij MAP/ml. V vodi napajalnikov smo v glavnem zaznali manj (10 do 10^4 MAP/ml), za kar so lahko različni vzroki. Ena izmed možnosti je kontaminacija s fecesom ene ali več krav, z nižjo koncentracijo MAP. Pri analizi fecesa različnih krav s sumom na paratuberkulozo smo opazili razpon obremenitve z MAP od 10^3 do 10^8 bakterij/g fecesa (Priloga C2), kar bi lahko pojasnilo opažene koncentracije MAP v napajalnikih. Druga možnost je, da MAP slabo preživi v vodnem okolju napajalnikov, zaradi česar pride do znižanja koncentracij MAP. Študije sicer kažejo da je MAP (DNK) v napajalnikih obstojna tudi po leto dni, v primeru, da ni bilo novih vnosov kontaminiranega fecesa, kar pa v našem primeru težko trdimo (Cook in sod., 2010). Tretja, najbolj verjetna možnost je, da se MAP poseda s suspendiranimi delci in se koncentrira v usedlinah in biofilmih. V vzorcih betonskih napajalnikov, kjer smo hkrati zajeli biofilm in usedlino, smo zaznali do 100-krat več MAP kot v sami vodi (10^4 do 10^6 MAP/ml). IS*900* pozitivni so bili tudi biofilmi suhih napajalnikov in biofilmi na cevih odpadne vode s kmetije B. Ti rezultati nakazujejo, da je biofilm eden izmed pomembnih habitatov MAP v okolju. Za MAP, kot tudi za ostale mikobakterije, je znano, da jim izrazito hidrofobna celična stena omogoča lažje pripenjanje na površine in penetracijo v že obstoječe biofilme (Kazda in sod., 2009). To je lahko vzrok za opažene višje koncentracije MAP v biofilmih v primerjavi z vodnimi vzorci. Po drugi strani je možno, da pogoji v biofilmih MAP dodatno specifično omogočajo dolgoročno perzistenco ali celo razmnoževanje. Bakterije v biofilmih izločajo velike količine ekstracelularnega

polimernega matriksa, ki lahko dalj časa zadržuje vodo tudi v sušnih obdobjih (Flemming in sod., 2007). Ker je za MAP značilno, da preživi precej dalj časa v vlažnih kot v suhih okoljih (Whittington in sod., 2005), ji biofilm s tega vidika nudi boljše pogoje dolgoročnega preživetja. Poleg tega so različne bakterije v biofilmih v tesnih stikih, kar omogoča učinkovitejšo komunikacijo in kooperacijo preko izmenjave nutrientov, metabolitov in mineralov (Flemming, 2011). To pomeni, da ima MAP v biofilmih precej večjo verjetnost, da se nahaja v območju difuzije kompatibilnih siderofor drugih bakterij, sorodnih mikobakterij ali celo drugih podvrst bakterij *M. avium*, kar bi ji omogočalo privzem železa brez lastne produkcije mikobaktina. Poleg tega imajo v biofilmih večjo možnost, da jih fagocitirajo amebe, v katerih preživijo dalj časa in so zaščitene pred zunanjim okoljem (Pickup in sod., 2007). Seveda se postavlja vprašanje, ali je MAP v okolju biofilmov sploh viabilna ali ne, kar z uporabljeno metodo PCR težko določimo, saj zaznavamo DNK in ne nujno živih celic. To pomanjkljivost PCR metode se lahko kompenzira s predhodno obdelavo vzorcev s propidijevim (PMA) ali etidijevim monoazidom (EMA) (Kralik in sod., 2010; Nogva in sod., 2003). Obe spojini se vežeta na ekstracelularno dvoverižno DNK in jo po fotoaktivaciji kemijsko modificirata na način, da je s PCR ni mogoče pomnožiti. Na ta način lahko s PCR zaznamo le DNK iz živih celic (Nogva in sod., 2003). Vendar ima metoda številne omejitve, zlasti v okoljskih vzorcih. Nepopolna penetracija PMA in EMA v vzorce biofilmov, sedimentov lahko privede do precenjenega števila živih celic. Neprepustnost celičnih membran za obe spojini prav tako onemogoča zaznavo mrtvih intracelularnih bakterij v praživalih. Po drugi strani so v okolju pogoste oblike viabilnih celic z reverzibilnimi poškodbami membrane, ki omogočajo penetracijo PMA in EMA, ter posledično napačno negativni rezultat s PCR. Kompleksni matriksi okoljskih vzorcev lahko povzročijo kemijsko adsorpcijo obeh spojin in zmanjšano učinkovitost, zaradi česar je potrebno prilagoditi protokol obdelave za vsak posamezni matriks. Slabša učinkovitost velja tudi za vzorce z visokimi količinami mrtvih mikroorganizmov oziroma ekstracelularne DNK (Fittipaldi in sod., 2011). V prid viabilnosti MAP v biofilmih v našem primeru kaže raziskava Cooka in sodelavcev (2010), kjer so pokazali, da se koncentracija MAP, določena z Real-time PCR na IS*900*, v biofilmih na betonskih napajalnikih ni spremenila v 365 dneh, kolikor je trajal poskus (Cook in sod., 2010). To pomeni, da je bila MAP v biofilmih statična, vendar viabilna, saj bi gola DNK v tem času morala kazati znake degradacije. Možno, da je bil prirast enak odmiranju ali pa je šlo dejansko za celice v dormantni fazi (Archuleta in sod., 2005). V prid viabilnosti MAP kažejo tudi rezultati v vzorcih starih deponij na obeh kmetijah. Kljub temu, da na stari deponiji ni bilo dotoka svežega gnoja več mesecev, sta bili obe deponiji pozitivni za IS*900*. Gola DNK težko preživi razgradnjo v mikrobiološko tako bogatem okolju, čeprav ne moremo z zagotovostjo trditi, da je šlo za žive celice. Tekom fermentacije gnoja, okuženega z MAP, so zaznali viabilne bakterije do dva meseca po začetku fermentacije, zatem so bili vzorci pozitivni za IS*900* še 14 mesecev (Slana in sod., 2011). Razlog za to je lahko nekultivabilnost, česar tudi avtorji niso izključili. Nekultivabilnost je značilna za dormantno fazo bakterij. Slednjo lahko sprožijo neugodni okoljski pogoji kot so pomanjkanje nutrientov, oksidativni stres in prisotnost toksičnih snovi (npr. antibiotikov). Celice v dormantni fazi se ne delijo in imajo znižano metabolno aktivnost kar lahko bistveno podaljša preživetje v neugodnih pogojih (Hayes in Low, 2009). Pri bakteriji *M. tuberculosis* se dormantna faza lahko vzpostavi tudi kot posledica pomanjkanja železa (Baek in sod., 2011). Mehanizmi dormance so ohranjeni tudi pri bakterijah podvrste *M. avium* (Archuleta in sod., 2005; Nikitushkin in sod., 2013), zato je možno, da MAP v okolju zaradi pomanjkanja železa (kot posledica okvare v sintezi sideroforov) lahko predčasno vstopi v dormantno fazo (če ne upoštevamo drugih razlogov

za vstop v dormantno fazo). To ji omogoči dolgoročno preživetje dokler ne vstopi v novega gostitelja, kjer se ponovno vzpostavijo pogoji, ugodni za rast, predvsem z vidika privzema železa.

Eden izmed pomembnih dejavnikov perzistence MAP v okolju naj bi bila tudi izpostavljenost soncu. V vzorcih iz prisojnih površin viabilnost MAP precej hitreje upada kot v senčnih (Whittington in sod., 2005). Na kmetiji B sta bili stara in nova deponija julija 2011, za razliko od maja 2010, negativni za IS*900*. Hkrati smo opazili, da sta bili ob julijskem vzorčenju deponiji popolnoma izsušeni, kot posledica izpostavljenosti soncu in poletnih temperatur. To bi lahko bil vzrok za negativen rezultat, še zlasti ker je bil vzorec odvzet iz zgornje posušene plasti. Alternativno je preživetje MAP v suhih vzorcih lahko vezano na druge podvrste bakterije *M. avium*, ki bi ji omogočale preživetje z zagotavljanjem siderofor. Za MAH npr. je znano, da je bolj pogosto prisotna v vlažnih vzorcih (Kazda in sod., 2009).

Primerjava vseh vzorcev kaže na to, da so bile na kmetiji A v vzorcih, ki so vsebovali feces, približno 1000-krat višje koncentracije MAP kot v vseh ostalih vzorcih, medtem ko se na kmetiji B količina MAP med vzorci, ki so vsebovali feces, in ostalimi vzorci ni statistično razlikovala. Slednje je predvsem na račun vzorcev iz razreda površinskih stoječih in tekočih voda, kamor smo prišteli več vzorcev iz različnih točk iztoka odpadne vode iz kmetije B, ki je bil (po vonju) močno obremenjen z organskim onesnaženjem (najverjetneje feces iz hleva). Posledično so bile tudi koncentracije MAP v teh vzorcih višje (okoli 10^6 MAP/ml), kar je dvignilo povprečno količino MAP in povečalo standardno deviacijo v tej skupini vzorcev.

Nasplošno je bil delež IS*900* pozitivnih vzorcev najvišji v razredu vzorcev, ki so vsebovali feces. V ostalih razredih je bil delež večinoma nižji, vendar so se razmerja deležov IS*900* pozitivnih vzorcev v posameznih razredih in med razredi ohranjala (Slika 16). To pomeni, da se MAP ni nahajala izključno le v vzorcih, ki so vsebovali feces, temveč je bila kontaminacija z MAP enakomerno porazdeljena tudi med ostale razrede okoljskih vzorcev. Prisotnost MAP v okolju je tako lahko dober indikator za ugotavljanje prisotnosti infekcije pri govedu na kmetiji, kar ugotavljajo tudi v drugih raziskavah (Lombard in sod., 2006). To vsekakor drži v primeru prisotnosti goveda, ki izloča velike količine MAP v feces, s čimer so povišane količine MAP tudi v okoljskih vzorcih. V primeru, da je prisotno le govedo v zgodnji fazi infekcije, je detekcija v okolju vprašljiva, saj takšne živali lahko izločajo precej nižje količine MAP v fecesu (Van Schaik in sod., 2003). Verjetnost detekcije v takšnih primerih je vsekakor odvisna tudi od uporabljenih metod. V okviru naše raziskave smo razvili visoko učinkovito metodo za izolacijo DNK iz kompleksnih vzorcev, ki omogoča do sedaj najboljše izkoristke mikobakterijske DNK iz fecesa okuženih živali (Logar in sod., 2012). Razvita metoda izolacije DNK v kombinaciji z Real-time PCR omogoča detekcijo MAP tudi v fecesu goveda, ki izločajo majhne količine MAP ($<10^4$ MAP/g fecesa, subklinična faza) in jih je sicer nemogoče zaznati s klasičnimi mikrobiološkimi (Logar in sod., 2012). Z Real-time detekcijo IS*900* iz DNK, izolirane po razviti metodi, smo uspeli doseči od 3 do 10-krat nižjo meje detekcije MAP v fecesu v primerjavi z dosedanjimi protokoli (Kralik in sod., 2011; Zhang in Zhang, 2011). Visoka učinkovitost izolacije s to metodo nam je omogočala detekcijo IS*900* tudi v manj kontaminiranih vzorcih, ki bi jih morda z drugimi metodami zaznali kot negativne. Res pa je, da nismo testirali učinkovitost metode prav na vseh tipih okoljskih vzorcev, zaradi česar obstaja možnost, da je bila učinkovitost z določenimi matriksi slabša, kot določeno v primeru fecesa (ali večja).

Kontaminacija okolja z MAP je bila stabilna na kmetiji A, ne glede na čas vzorčenja. Tako spomladi, poleti in jeseni v obdobju dveh let se povprečna količina MAP v vzorcih in struktura pozitivnih vzorcev nista spreminjali. Čeprav nimamo podatkov o morebitnih preventivnih ukrepih ali drugih dogodkih, ki so se odvijali na kmetiji od začetka vzorčenja, vidimo stabilno stanje prekuženosti okolja, kar kaže na visoko perzistenco MAP v okolju ali konstanten vnos MAP v okolje preko fekalne kontaminacije. Moravkova in sodelavci so ugotovili, da se povprečna količina MAP v okolju ni spremenila tudi 2 leti po depopulaciji in dezinfekciji kmetije (Moravkova in sod., 2012). Za razliko od kmetije A smo na kmetiji B zaznali upad koncentracije MAP v poletnih mesecih za faktor 100 v vseh vzorcih. To je lahko posledica drugačne prakse reje, npr. da se govedo na kmetiji A redno pušča na pašnike zaradi česar je širjenje kontaminacije z MAP konstantno, na kmetiji B pa je izpust živine omejen na določena časovna obdobja. Razlog bi lahko bilo tudi izvajanje preventivnih ukrepov, s katerimi bi se okužene živali izoliralo ali celo izočilo iz črede, zaradi česar bi pričakovali nižje količine MAP v okolju. Možno je, da obstajajo razlike zaradi drugačnih geografskih pogojev na obeh kmetijah in vremenskih razmer v času vzorčenja. Kmetiji sta sicer med seboj oddaljeni manj kot 5 km in obe ležita na karbonatni podlagi, prekriti z rahlo kislo (pH 5,5-6,6) prstjo iz razreda kambisolov/rjavic (www.geopedia.si). Z vidika prsti in podlage vsaj na makroskopskem nivoju ni razlike, ki bi razložila upad koncentracij MAP sam na kmetiji B. Vzorčenje na kmetiji B je bilo izvedeno 26. julija 2011, kar je bilo tik za obilnim deževjem v tej regiji, medtem ko v času vzorčenja kmetije A julija 2010 obilnejših padavin ni bilo (Cegnar, 2011a; Cegnar in Gorup, 2010a). Spiranje površine zaradi deževja bi lahko povzročilo opaženo razredčitev količine MAP v vzorcih iz kmetije B ob poletnem vzorčenju 2011. Vsa vzorčenja na kmetiji A so bila izvedena v suhem vremenu, obilnejšega deževja ni bilo vsaj tri dni pred vzorčenjem (Cegnar, 2011b; Cegnar in Gorup, 2010b). Iz tega je razvidno, da padavine na kratki rok lahko bistveno vplivajo na kontaminacijo okolja kmetij, v našem primeru bolj kot sezonski pogoji. Nespremenjene količine MAP na sezonski ravni na kmetiji A so verjetno bolj posledica trenutnih vremenskih razmer v času vzorčenja kot vremenskih razlik na sezonski ravni. V suhem obdobju se okolje rekontaminira zaradi prostega gibanja živine in ostalih rednih aktivnosti na kmetiji. Za natančnejšo določitev dinamike MAP v okolju bi bilo vsekakor potrebno bolj pogosto vzorčenje in obsežna karakterizacija vseh naštetih faktorjev, kot tudi spremljanje meteoroloških parametrov, ter bolj natančna kemijska in fizikalna analiza vzorcev.

5.1.2.2 Razširjenost drugih podvrst bakterije *M. avium* in njihova povezava z bakterijami podvrste MAP

Z detekcijo IS*1245* v okolju smo želeli pogledati kako si bakterije podvrste MAP delijo življenjski prostor z drugimi, sorodnimi vrstami mikobakterij, ki bi lahko bile vir mikobaktinov za MAP. IS*1245* sicer ni specifična le za eno podvrsto, saj je prisotna tako v *Mycobacterium avium* podvrste *avium* (MAA), *Mycobacterium avium* podvrste *hominissuis* (MAH) in *Mycobacterium avium* podvrste *silvaticum* (MAS). MAS in MAA sta povzročiteljici aviarne tuberkuloze, redko povzročata infekcije tudi pri drugih živalih in ljudeh. Večina dosedanjih študij je redko izolirala MAA in MAS iz okolja (Kazda in sod., 2009), z izjemo območij, kjer živi (npr. v ujetništvu ali reji) večje število okuženih ptic (Dvorska in sod., 2007). MAA je sicer podobno kot MAP sposobna preživeti v okolju dalj časa, čeprav se ne ve ali gre za aktivno ali pasivno preživetje. MAA lahko preživi do 50

mesecev v perutninskih iztrebkih, 25 mesecev v zgornji plasti (5 cm) zemlje in le en mesec v telesnih izločkih, ki so izpostavljeni soncu (Friend in Franson, 1999). Po drugi strani je MAH okoljska bakterija in je zato precej bolj pogosto izolirana iz različnih naravnih okolij, poleg okolij seveda, kjer živijo okužene živali (Kazda in sod., 2009). Iz tega vidika obstaja večja verjetnost, da v okolju, kjer ni prisotnih živali, okuženih z MAH ali MAA, najdemo z detekcijo IS*1245* predvsem MAH. IS*1245* je pri MAA tudi v 10-krat nižjem številu kopij kot pri MAH (Pate in sod., 2005), kar pomeni slabšo mejo detekcije. Ne glede na to, katero izmed mikobakterij smo zaznali v vzorcih, je bil namen pokazati predvsem to, da si podvrste bakterije *M. avium* delijo življenjski prostor, zaradi česar med njimi lahko prihaja do interakcij, tudi v smislu izmenjave siderofor. Presek življenjskih prostorov smo v naši raziskavi tudi potrdili, saj je bilo kar 41,4 % vzorcev na kmetiji A in 50 % vzorcev na kmetiji B pozitivnih za IS*1245*. Možnost da smo z uporabljenim setom začetnih nukleotidov namesto MAH/MAA zaznali druge bakterije je majhna, saj so bili nukleotidi predhodno obsežno testirani in niso kazali navzkrižne reaktivnosti s sorodnimi mikobakterijami in drugimi bakterijami (Slana in sod., 2010). Specifiko smo dodatno potrdili s sekveniranjem naključnih PCR pomnožkov iz vzorcev, pri čemer so vsa zaporedja 100% nalegala na IS*1245 M. avium* iz baze zaporedij Genebank.

V nasprotju s pričakovanjem je bila večina IS*1245* pozitivnih vzorcev na kmetiji A iz razreda vzorcev, ki so vsebovali feces, in sicer v precej večjem deležu, kot je bilo teh vzorcev med vsemi vzorci. To kaže na preferenčno lokalizacijo MAA/MAH v vzorcih s fecesom. Razlog za to lahko morda iščemo v pogojih, ki vladajo v takšnih vzorcih. Gre za okolje z visoko vsebnostjo organskih snovi, zaradi fermentacije lahko pričakujemo tudi nižji pH, višjo temperaturo in nižje ravni kisika ter vlago, kar so vsekakor pogoji, ki ustrezajo tako MAH kot MAA (Kazda in sod., 2009). Zato obstaja možnost, da se MAA/MAH bogatita v takšnem okolju, medtem ko se v drugih vzorcih hitro razredčita. Za MAA so pokazali, da lahko raste v kravjem fecesu, medtem ko so poročila za MAH redka. Vse podvrste bakterije *M. avium*, vključno z MAP, sicer lahko dalj časa preživijo tako v kravjem fecesu/gnoju, kot v gnojnici (Kazda in sod., 2009). Za razliko od MAH in MAA, je dotok MAP v okolje konstanten (zaradi premikanja in iztrebljanja okužene živine v okolici kmetije npr.), zaradi česar je kontaminacija enakomerno porazdeljena po različnih razredih vzorcev.

Na kmetiji B je bila porazdelitev IS1245 pozitivnih vzorcev drugačna, kar ponovno kaže na razlike v karakteristikah obeh kmetij. Z izjemo majskega vzorčenja 2010, je bilo največ IS*1245* pozitivnih vzorcev še vedno iz razreda vzorcev, ki so vsebovali feces (45 %). Vendar je bilo razmerje pozitivnih vzorcev proti vsem iz tega razreda vzorcev podobno kot v drugih razredih, kar kaže na enakomerno porazdelitev IS*1245* med vsemi razredi vzorcev, podobno kot v primeru IS*900*. Julija 2011 smo na kmetiji zaznali precej nižje koncentracije IS*900* kot maja 2010, kar je bilo domnevno zaradi obilnega deževja v času vzorčenja in spiranja površin. Glede na to, da smo nasplošno IS*1245* večinoma zaznali v vzorcih, ki so vsebovali feces, lahko predpostavljamo, da bi spiranje MAH/MAA iz teh vzorcev zaradi deževja povzročilo, da se porazdelijo bolj enakomerno tudi med ostalimi vzorci. Druga možnost bolj enakomerne porazdelitve IS*1245*, v trendu porazdelitve IS*900*, bi bila infekcija goveda z MAA ali MAH (Dvorska in sod., 2004; Pavlik in sod., 2005) ali celo koinfekcija z MAP (Glawischnig in sod., 2006; Moravkova in sod., 2008), zaradi česar se okolje enakomerno kontaminira z fecesom okuženih živali.

Koinfekcija oziroma skupni življenjski prostor različnih mikobakterij ali podvrst bakterij *M. avium* podaja nove možnosti, kako MAP preživi v okolju brez sinteze mikobaktina. Za prvo izolacijo MAP sta Twort in Ingram 1912 uporabila ekstrakt iz *M. phlei*, v katerem je

bila ključna sestavina za rast prav mikobaktin. Dandanes se za rast MAP uporablja mikobaktin J iz seva NADC 18, ki je bil klasificiran kot MAH (Chiodini, 1993). To kaže na to, da MAP lahko uporablja mikobaktin iz sorodnih mikobakterij, z največjo učinkovitostjo pa mikobaktin iz sorodnih podvrst bakterije *M. avium*. V primeru skupnega življenjskega prostora, bi v pogojih pomanjkanja železa MAP lahko koristila sproščene siderofore drugih *M. avium* podvrst. V naši raziskavi smo pokazali, da je korelacija med pojavljanjem IS*900* in IS*1245* statistično pomembna (p=0,002), kar pomeni, da prisotnost ene IS ni neodvisna od druge. Opazili smo, da je kar 91 % IS*1245* pozitivnih vzorcev bilo pozitivnih tudi za IS*900*, zaradi česar je bila prisotnost IS*1245* dober prediktor za prisotnost MAP. Obratna povezava je bila slabša, 45,3 % IS*900* pozitivnih vzorcev je bilo pozitivnih tudi za IS*1245*. V primeru odvisnosti MAP od drugih podvrst *M. avium* bi pričakovali ravno obratno. Vendar MAP lahko poleg mikobaktina podvrst bakterije *M. avium* z različno učinkovitostjo uporablja tudi druge ksenosiderofore, zaradi česar ni nujno odvisna samo od prisotnosti *M. avium* podvrst. MAP lahko z enako učinkovitostjo kot mikobaktin uporablja npr. desferioksamin B bakterij iz rodu *Streptomyces* in acinetoferin bakterij iz rodu *Acinetobacter* (Gardner in sod., 2004; Guo in sod., 2002). Tudi pri *M. smegmatis* in *M. fortuitum* so ugotovili možnost alternative rabe ksenosideroforov, kot so miksohelin C (*Stigmatella sp.*), seratiohelin (*Serratia sp.*) ter glivna siderofora rizoferin (*Rhizopus sp.*) in ferikrocin (*Asperigillus sp.*) (Matzanke in sod., 1997). To nakazuje na možnost, da je tudi pri MAP spekter uporabnih siderofor precej večji, kot je do sedaj znano, in prisotnost MAP ni nujno vezana le na podvrste *M. avium*, temveč lahko korelira tudi s prisotnostjo drugih bakterij. Nenazadnje smo pokazali, da je bila koncentracija MAP v IS*1245* pozitivnih vzorcih na kmetiji A vsaj 10-krat višja kot v IS*1245* negativnih vzorcih. To kaže na možen stimulativen učinek *M. avium* podvrst na MAP, lahko je tudi posledica dejstva, da smo IS*1245* na kmetiji A najpogosteje zaznali v vzorcih, ki so vsebovali feces, ti pa so imeli višje koncentracije MAP predvsem na račun kontaminacije s fecesom okuženega goveda. Na kmetiji B, kjer je bila prisotnost IS*1245* bolj enakomerno porazdeljena po razredih vzorcev, razlik v koncentracijah MAP med IS*1245* pozitivnimi in IS*1245* negativnimi vzorci nismo opazili. Tudi v primeru, da prisotnost drugih *M. avium* podvrst ima stimulativen učinek na MAP, ni nujno da bi to opazili kot povišane količine MAP v IS*1245* pozitivnih vzorcih. Če druge podvrste dejansko omogočajo rast MAP v okolju, je lahko hitrost rasti MAP v okolju precej manjša kot pri drugih podvrstah, zato večjih porastov v koncentracijah MAP ne bi pričakovali. Po drugi strani stimulativen učinek podvrst *M. avium* na MAP (npr. zagotavljanje siderofor) ni nujno v smislu spodbujanja rasti, temveč bolj vzdrževanja bazalnega metabolizma, saj so v okolju prisotni tudi drugi pogoji (npr. nizka temperatura) ki niso optimalni za rast in razmnoževanje MAP.

5.1.2.3 Perzistenca MAP v okolju v povezavi z amebami

Amebe (kot tudi druge praživali) imajo v okolju pomembno vlogo pri dinamiki mikrobnih združb. Različne amebe imajo različne preference glede bakterij, s katerimi se prehranjujejo, zato lahko bistveno vplivajo na diverziteto bakterijske združbe (Rosenberg in sod., 2009). Nekatere bakterije amebe izkoriščajo v svoj prid, s tem da so razvile mehanizme, ki jim omogočajo preživetje znotraj ameb. Tako so zaščitene pred neugodnimi zunanjimi dejavniki, podvržene manjši kompeticiji, hkrati imajo dostop do nutrientov v amebnih prebavnih vakuolah (Harb in sod., 2000). Prilagoditev na intracelularni način življenja v amebah je domnevno vodila do evolucije patogenov, ki so sposobni preživeti in se razmnoževati intracelularno tudi v makrofagih različnih gostiteljev (Greub in Raoult,

2004). Za večino mikobakterij so pokazali, da preživijo fagocitozo ameb (Preglednica 2.1). Kakor v makrofagih, tudi v amebah mikobakterije zaustavijo zorenje prebavne vakuole, kar jim omogoča intracelularno preživetje. Glede na to, da je MAP zmožna razmnoževanja v gostiteljevih makrofagih brez mikobaktina (Mura in sod., 2006), se domneva, da s podobno strategijo uspe preživeti tudi v amebah. To bi vsaj delno pojasnilo opaženo perzistenco MAP v okolju. Amebe naj bi MAP tako ščitile pred zunanjimi dejavniki in hkrati omogočale ugodno okolje za perzistenco, če ne celo rast. Prisotnost ameb v večini vzorcev smo s pregledom pod mikroskopom potrdili tudi v naši raziskavi, do klonalnih populacij smo izolirali tudi tri različne vrste *Hartmanello sp.*, *Acanthamoebo sp*. in *Vannella sp.* Tako *Hartmannella* kot *Acanthamoeba* sta že bili izolirani iz podobnih okolij in že večkrat impliciran kot gostiteljici mikobakterij (Thomas in sod., 2010), medtem ko za interakcijo med *Vannello* in mikobakterijami ni obstoječih publikacij. Na žalost poskusov z *Vannello* tudi mi nismo izvedli, ker je kultura tekom precepljanj izgubila viabilnost. V primeru *Acanthamoebe* in *Hartmanelle* smo ugotovili, da se nobena izmed njiju ne prehranjuje z MAP ali z MAH, medtem ko je *E. coli* dobro podpirala rast obeh. To posredno potrjuje vlogo mikobakterij kot na amebe odporne bakterije. Nismo pa odgovorili na vprašanje, ali je opažena odpornost posledica mikobakterijske inhibicije lastne razgradnje po fagocitozi, ali do fagocitoze sploh ni prišlo zaradi hidrofobne narave mikobakterijske celične stene oz. kakšnega drugega fiziološkega faktorja. Z amebe je sicer znano, da ne morejo rasti na vseh bakterijah, preference za bakterije se razlikujejo med vrstami ameb (Weekers in sod., 1993). Na to vpliva predvsem velikost bakterij, struktura celične stene, v veliki meri tudi obrambni mehanizmi bakterij in ustrezne amebne adaptacije na takšne mehanizme. Takšni mehanizmi so npr. sprememba morfologije bakterije, ki oteži fagocitozo, formacija mikrokolonij, povečana motilnost ali celo izločanje toksinov (Matz in Kjelleberg, 2005). Večina prejšnjih raziskav je pokazala, da podvrste bakterije *M. avium* vstopajo v amebe (Cirillo in sod., 1997; Miltner in Bermudez, 2000). V naših poskusih z barvanjem po Ziehl-Neelsenu nismo uspeli zaznati intracelularnih mikobakterij, predvsem na račun slabe resolucije, velikokrat smo opazili rdeče obarvane celične strukture tudi na negativnih kontrolah z amebami, brez mikobakterij, zaradi česar metoda ni bila zanesljiva. Za bolj natančno določitev intracelularne lokalizacije MAP in MAH bi bilo potrebno uporabiti metodo FISH ali pripraviti preparate za elektronsko mikroskopiranje (Mba Medie in sod., 2011). V posrednih poskusih v naši raziskavi nismo potrdili intracelularne lokalizacije MAH in MAP. Tekom 15-dnevnega eksperimenta nismo opazili izločanja mikobakterij iz ameb. Tudi iz ameb, ki so lizirale, nismo opazili nastanka vidnih kolonij morebitnih intracelularnih mikobakterij. Sproščanje mikobakterij nismo opazili niti v primeru, ko so amebe tvorile ciste izven mesta inokulacije na 7H10 agarju, po 10 dnevni inkubaciji na 37 °C. Vsaj v primeru bakterij podvrste MAP je to lahko posledica prekratke inkubacijske dobe, saj do vidnih kolonij običajno potrebujejo vsaj 3 tedne. Možno, da v naših eksperimentalnih pogojih amebe niso fagocitirale mikobakterij. V primerjavi z ostalimi raziskavami smo uporabljali precej višje multiplicitete infekcije (amebe:mikobakterije v našem poskusu $1:10^3$ do $1:10^5$ v primerjavi z 1:1 do 1:100), čeprav ista multipliciteta amebam ni preprečevala hranjenja z *E. coli*. Za uspešno infekcijo ameb je pomemben dober kontakt med amebami in bakterijami, kar smo z našimi multiplicitetami infekcij vsekakor zagotovili. Obstaja možnost, da je do fagocitoze prišlo, vendar MAH in MAP ne izstopata iz ameb na tako kratki rok in ostaneta intracelularni tudi po tvorjenju cist. Nekatere mikobakterije kot sta *M. tuberculosis* in *M. marinum* naj bi izstopale nelitično iz ameb še pred tvorjenjem cist, v tako imenovanih ejektosomih (Hagedorn in sod., 2009), medtem ko za podvrste bakterije *M. avium* poročajo, da preživijo v cistah (Ben Salah in Drancourt, 2010), tudi bakterije podvrste MAP (Mura in

sod., 2006). Glede na to, da v primeru inkubacije ameb z MAP in MAH nismo opazili lize ameb, predvidevamo, da intracelularna lokacija MAH in MAP ni neposredno škodljiva za amebe, temveč mikobakteriji živita simbiontsko ali latentno. Kar smo opazili, je bila izredna afiniteta bakterij MAH za površino ameb iz rodu *Acanthamoeba*, zaradi česar so amebe vlekle bakterije za seboj. Amebe so na ta način za seboj puščale sled bakterij, ki so po večdnevni inkubaciji tvorili izven začetnega mesta inokulacije večje ali manjše satelitske kolonije, odvisno od gojišča v podlagi. Pri MAP tega nismo opazili, kar je mogoče zaradi precej manjših celic, ki so bile slabo vidne pri 100-kratni povečavi (maksimalna povečava za opazovanje površine gojišč v petrijevki). Razlika v dolžini celic med MAP in MAH ni bila tako opazna v tekočem gojišču, na agarju so celice MAH dobile izrazito podolgovato bacilasto obliko, kar bi lahko bil eden izmed obrambnih mehanizmov pred plenjenjem protozojev (Matz in Kjelleberg, 2005). To nakazuje na možnost, da MAH sama kontrolira, kdaj bo na voljo za fagocitozo amebam. Za intracelularne patogene obrambni mehanizem proti fagocitozi ameb ne bi bil smiseln, saj bi jim tako zmanjšal možnost za preživetje. Ker pa MAH ni striktni patogen, temveč je primarno okoljska bakterija, lahko pričakujemo, da ji intracelularno življenje koristi le v neugodnih pogojih v okolju, kot npr. pomanjkanje nutrientov, neugodni fizikalni in kemijski pogoji ter močna kompeticija. V naših poskusih smo opazili zmerno rast MAH tudi na NN agarju, verjetno zaradi rezidualnih nutrientov. Prav tako ni bilo kompeticije, zaradi česar obstaja možnost, da MAH v takšnih pogojih s spremembo morfologije aktivno preprečuje fagocitozo. Po drugi strani je spremenjena morfologija lahko le pasivna posledica metabolnega stanja MAH, saj so metabolno aktivne celice običajno precej večje kot pasivne (Ojha in sod., 2000). Pri MAP na NN agarju takšnih morfoloških sprememb nismo opazili. To bi lahko pomenilo nižjo metabolno aktivnost ali celo inaktivnost MAP v teh eksperimentalnih pogojih, kar je lahko delno posledica nezmožnosti privzema železa (mikobaktina nismo dodali). Iz analogije z MAH bi sklepali, da jim takšno metabolno stanje (dormanca?) preko morfologije omogoča lažji vstop v amebe oz. jih amebe lažje/neovirano fagocitirajo. Za razliko od MAH bi MAP, kot domnevno obligatnem patogenu, to vsekakor koristilo za preživetje v okolju, do naslednjega vstopa v gostitelja.

Interakcije med amebami in mikobakterijami so zaenkrat precej slabo raziskane in so v glavnem omejene na sposobnost preživetja v različnih fazah rasti ameb. V več študijah so prikazani različni scenariji interakcij (Preglednica 1): i) mikobakterije, ki ne preživijo fagocitoze, ii) mikobakterije, ki preživijo fagocitozo, se razmnožujejo v amebi in izstopajo iz nje; iii) mikobakterije, ki preživijo fagocitozo, se ne delijo, temveč živijo v neke vrste simbiozi z amebami in preživijo tudi ciste in iv) mikobakterije, ki preživijo fagocitozo, in lizirajo amebo. Vse te interakcije so bile ugotovljene le na parih vrstah ameb, zato je možno, da enak spekter interakcij pogojuje tudi vrstna specifika ameb, ne samo mikobakterij. Vprašanja, ki se postavljajo in na katere je potrebno odgovoriti je zakaj se interakcije razlikujejo, kaj jih pogojuje in kako se navezuje to na preživetje v makrofagih, kar je še zlasti pomembno za patogene mikobakterije. V zvezi s perzistenco MAP v okolju je potrebno dodatno raziskati, kakšna je vloga MAP v amebi, gre za simbiozo ali parazitski odnos. Tako za amebe iz rodu *Acanthaomeba* kot *Hartmannella* smo pokazali, da sta prisotni v istem okolju kakor MAP. Če na podlagi dosedanjih in vitro raziskav sklepamo, da MAP vstopa v amebe tudi v naravnem okolju, hkrati pa se ne ena, ne druga ameba ne moreta prehranjevati z MAP, potem lahko pričakujemo, da bo poleg MAP v amebi tekom življenja amebe velik pretok drugih bakterij. Te bakterije so lahko občutljive ali odporne na fagocitozo, lahko gre celo za sorodno vrsto npr. MAA in MAH. Zanimivo vprašanje je, v kakšni meri intracelularna MAP interagira s temi bakterijami, in ali ima MAP na ta način dostop do nutrientov, mogoče celo siderofor in kako ji to pomaga pri preživetju. Kdaj in

zakaj (če sploh) MAP postane ponovno ekstracelularna, preden pride v novega gostitelja ali so amebe kot neke vrste zaščitna kapsula, v kateri MAP preživi kislo pot do gostiteljevega črevesja.

5.1.3 Vpliv pomanjkanja železa na odpornost na antibiotike

Homeostaza železa je nujna za normalno funkcioniranje celice. Tako pomanjkanje kot višek železa celico pahneta v neravnovesje, ki je lahko kritično za njeno preživetje. V obeh primerih se bakterija odzove z aktivacijo sistemov, ki skušajo ponovno vzpostaviti ravnovesje. Gre za metabolno adaptacijo, ki ima za posledico precej drugačen fenotip od tistega, ki je prisoten v pogojih ravnotežja (Bacon in sod., 2007). Takšen fenotip ima lahko signifikantno drugačen profil odpornosti na antibiotike. Zlasti pri MAH, ki povzroča infekcije pri človeku, je takšen podatek izrednega pomena za učinkovito zdravljenje infekcij. Okolje makrofagov je restriktivno kar se tiče koncentracij železa, morebitno povišana odpornost na antibiotike bi lahko vplivala na slabšo učinkovitost zdravljenja ali pojavljanja rezistentnih infekcij.

5.1.3.1 Vpliv pomanjkanja železa na odpornost na antibiotike pri bakterijah podvrste MAH

V naši raziskavi smo potrdili, da se profili odpornosti na antibiotike v gojiščih z nizko koncentracijo železa razlikujejo precej razlikujejo od profilov v gojiščih, ki se bogata z železom in se običajno uporabljajo za določanje minimalnih inhibitornih vrednosti antibiotikov. Razlike smo opazili tako pri MAH 104 kot tudi pri MAP 468/09. Opažene razlike niso bile posledica različnih hitrosti rasti v gojiščih z različnimi koncentracijami železa, saj je bila rast v vseh gojiščih primerljiva (+/- 5%). Poleg tega razlike niso izvirale iz interakcij antibiotikov z železom v gojišču, ki bi lahko zmanjšale učinkovitost antibiotikov. V pogojih pomanjkanja železa ([Fe]$_-$) ali pogojih »akutnega« pomanjkanja železa ([Fe$_\Delta$]), kjer sta kulturi rastli v istem gojišču, le pred-pogojevanje je bilo drugačno, smo zaznali različne MIC vrednosti. Zaradi tega predvidevamo, da je so bile izmerjene razlike v občutljivosti na antibiotike dejansko posledica odziva bakterije na pomanjkanje železa.

Pri MAH 104 smo v pogojih stalnega ali akutnega pomanjkanja železa opazili povišano odpornost na 6-merkaptopurin (6-MP) in azitromicin (AZM), manjše povišanje pa tudi za streptomicin (STR) in levofloksacin (LVX). Tako 6-MP kot LVX interferirata z sintezo/replikacijo DNK, medtem ko AZM in STR oba inhibirata sintezo proteinov. To kaže na morebitno zmanjšano občutljivost omenjenih celičnih procesov v pogojih pomanjkanja železa. Čeprav se tiopurini (6-merkaptopurin) trenutno ne uporabljajo za zdravljenje infekcij z MAH, so makrolidi (azitromicin in klaritromicin), aminoglikozidi (streptomicin in amikacin) in fluorokinoloni (levofloksacin) med najbolj pogosto predpisanimi antibiotiki za boj z infekcijami te vrste. Glede na to, da so mikobakterije izpostavljene pomanjkanju železa *in vivo*, bi povišana odpornost na te antibiotike lahko prispevala k slabši učinkovitosti zdravljenja s temi razredi antibiotikov. Povišana odpornost pomeni, da sicer letalne koncentracije antibiotika postanejo subletalne, kar lahko povzroči razvoj rezistence (Kohanski in sod., 2010). Po drugi strani je pomanjkanje železa povzročilo povišano občutljivost MAH 104 na antibiotike isoniazid (INH), etambutol (EMB) in D-cikloserin (DCS), ki vsi interferirajo s sintezo celične stene. Mnogo

mikobakterijskih genov, ki so vpleteni v sintezo in preurejanje celične stene je pod IdeR regulacijo (Yellaboina in sod., 2006), poleg tega v odziv na pomanjkanje železa celična stena spremeni strukturo (Bacon in sod., 2007). Vse to kaže, da ima preurejaje celične stene pomembno vlogo pri odzivu na pomanjkanje železa in do so ti procesi ali fiziološko stanje celice, ki izhaja iz teh procesov, bolj občutljivi na antibiotike. Lounis in sodelavci so pokazali, da so povečane količine zaužitega železa korelirale z znižano baktericidno aktivnostjo EMB in INH pri infekcij z *M. tuberculosis*, kar le posredno sovpada z našimi rezultati (Lounis in sod., 2003). V neki drugi raziskavi so opazili, da je bila *M. tuberculosis* bolj občutljiva na INH v nizkih koncentracijah železa (Sritharan in sod., 2006), kar je v nasprotju z našimi rezultati. Za INH je sicer znano da je spojina, ki za baktericidno aktivnost najprej potrebuje aktivacijo z mikobakterijsko katalazo-peroksidazo *katG*, ki je pod je pod kontrolo od železa odvisnega regulatorja *FurA* (Master in sod., 2001). Delecija *furA* povzroči prekomerno izražanje *katG*, kar hkrati povzroči povišano občutljivost na INH zaradi povečane konverzije INH v aktivno obliko (Pym in sod., 2001). Gen za *furA* je lociran takoj za *katG* v *M. tuberculosis* in v MAH 104. Prepisuje se skupaj s *katG* in blokira lastno transkripcijo v prisotnosti Fe^{2+} kot kofaktorja z vezavo na prepoznavno mesto DNK v promotorski regiji (Sala in sod., 2003). Iz naštetega bi pričakovali, da je ob pomanjkanju železa višja transkripcija *katG*, višja pretvorba INH v aktivno obliko in tako povečana občutljivost na INH, kar smo opazili tudi v naših eksperimentih. Vendar pa so Sritharan in sodelavci pokazali, da je v pomanjkanju železa peroksidazna aktivnost KatG okrnjena, zaradi česar pride do manjše pretvorbe INH v aktivni intermediat. Poleg tega nizke koncentracije železa običajno korelirajo z znižanjem ravni KatG encima v celici (Rao in sod., 2008), kar pomeni da mora za ta encim obstajati dodatna regulacija. Razlog za razliko med našimi in rezultati Sritharana in sodelavcev ja lahko tudi obstoj alternativne aktivacije INH v pogojih pomanjkanja železa pri MAH. KatG je namreč od hema odvisna peroksidaza, ki za delovanje potrebuje železo kot kofaktor (Zámocký in sod., 2001). V pogojih pomanjkanja železa so neesencialni encimi, ki koristijo železo, običajno inhibirani (Jang in sod., 2009). Alternativno bi zato pri MAH vlogo aktivacije INH prevzela katera izmed od-hema-neodvisnih peroksidaz, ki se inducirajo ob pomanjkanju železa. MAH 104 ima v genomu več genov, ki predvidoma kodirajo za od hema neodvisne peroksidaze, vendar njihova aktivnost proti INH še ni bila raziskana.

Če povzamemo, vidimo da je pri MAH 104 celična stena občutljiva tarča fenotipa, prilagojenega na pomanjkanje železa. Kombinacija antibiotikov, ki zavirajo privzem železa (kot je domnevno 4-aminosalicilat) z antibiotiki, ki inhibirajo sintezo celične stene, bi lahko prinesla povišanje učinkovitosti zdravljenja mikobakterijskih infekcij. Vsekakor je potrebno poudariti, da je pomanjkanje železa le eden od dejavnikov, ki pogojuje fenotip MAH v interakciji z gostiteljevimi makrofagi. Na *in vivo* profil odpornosti na antibiotike vpliva kompleksno prepletanje večih gostiteljevih obrambnih mehanizmov (oksidativni stres, nizek pH, limitacija nutrientov), ki se razlikujejo med bolniki in so odvisni od stanja njegovega imunskega sistema, kot tudi od sevno-specifičnih interkacij z gostiteljem (Blumenthal in sod., 2005; Inderlied in sod., 1993). Vse to lahko povzroča nizke korelacije med *in vitro* določeno občutljivostjo na antibiotike ter *in vivo* odzivi, kar je pogost problem pri MAH. Simuliranje *in vivo* koncentracij železa v gojiščih za testiranje odpornosti bi bilo zato nujno za določanje MIC vrednosti antibiotikov, ki interferirajo z metabolizmom železa (kot sta npr. INH in 4-aminosalicilat).

5.1.3.2 Vpliv pomanjkanja železa na odpornost na antibiotike pri bakterijah podvrste MAP

V nadaljevanju smo pogledali, če razlika v homeostazi železa med MAH in MAP kakorkoli vpliva na drugačne profile odpornosti na antibiotike pri MAP. Trenutno obstaja zelo malo raziskav, ki bi se ukvarjale z MIC pri MAP, saj povezava med MAP in človeškim obolenjem (npr. Crohnova bolezen) še ni dokazana. V primeru reje goveda za človeško konzumacijo je regulacija glede uporabe antibiotikov zelo stroga, in se večinoma ne uporabljajo, razen v primerih visoke vrednosti živali.

V naši raziskavi smo pokazali, da je navkljub prepričanju o visoki intrinzični rezistenci *M. avium* podvrst, MAP 468/09 kazala relativno visoko občutljivost na večino uporabljenih antibiotikov. Občutljivost je bila višja kot pri MAH za večino antibiotikov, ne glede na koncentracijo železa v gojišču. Izjema je bil INH, na katerega je MAP kazala od 2 do 4-krat višjo odpornost. Glede na to, da je za baktericidnost INH potrebna aktivacija s peroksidazno aktivnostjo KatG, za katero je potrebno železo kot kofaktor (Sritharan in sod., 2006), vse kaže na to, da ima MAP v primerjavi z MAH večje pomanjkanje železa. To potrjujejo tudi opažanja, da se odpornost na INH ni bistveno spremenila v odziv na izpostavitev MAP pomanjkanju železa, saj zaradi nezmožnosti sinteze lastnega mikobaktina najverjetneje čuti pomanjkanje železa ne glede na koncentracijo železa v gojišču.

MAP je po izpostavitvi nizki koncentraciji železa kazala povišano občutljivost na večino antibiotikov. Za razliko od MAH je bila MAP občutljiva tudi na beta-laktamska antibiotika ampicilin in oksacilin, na slednjega celo 8-krat bolj v nizkih koncentracijah železa. Za mikobakterije je sicer značilna intrinzična odpornost na beta-laktamske antibiotike na račun produkcije številnih beta-laktamaz in penicilin vezavnih proteinov ter slabe prepustnosti njihove celične stene (Nampoothiri in sod., 2008). Vendar so glede na naše rezultate ti mehanizmi pri MAP drugačni kot pri MAH. Višja občutljivost MAP na beta-laktame je lahko posledica povišane penetracije teh antibiotikov čez celično steno ali večje občutljivosti celične stene zaradi oslabljene sposobnosti vzdrževanja redoks ravnotežja preko homeostaze železa (Kohanski in sod., 2007). V nasprotju z MAP smo pri MAH zaznali celo stimulativni efekt oksacilina, ki je bil povišan v gojišču z normalno koncentracijo železa. Zaenkrat še ni poročanj o podobnem efektu, to je lahko posledica *hormesis* učinka, kjer gre za povišano metabolno aktivnost, v našem primeru zaradi aktivacije transkripcije beta-laktamskih genov.

Precej razlik med obema bakterijama smo opazili pri odpornosti na 4-aminosalicilat (PAS) in salicilat v odvisnosti od koncentracije železa. PAS je eden izmed zgodnje odkritih protituberkuloznih antibiotikov, vendar pa mehanizem njegovega delovanja ni bil dokončno razjasnjen. Nekateri zagovarjajo njegovo vlogo pri inhibiciji sinteze folata (Chakraborty in sod., 2013), spet v drugih študijah so pokazali, da inhibira prvi korak pri sintezi mikobaktina, s kompetitivno vezavo na *mbtA* (Nagachar in Ratledge, 2010a). MAP 468/09 je kazala 32-krat višjo občutljivost na PAS kot MAH 104 v gojišču z nizko koncentracijo železa, medtem ko je bila razlika v gojišču z železom precej manjša. Poleg tega je bila inhibicija s PAS pri MAP 468/09 koncentracijsko odvisna, pri MAH 104 pa ne. Konstantno, koncentracijsko neodvisno, inhibicijo pri MAH 104 si lahko razlagamo s sposobnostjo kompenzacije. Inhibicija *mbtA* s PAS povzroči nezadostno produkcijo mikobaktina in s tem privzem železa. To bi načeloma sprožilo povišanje produkcije salicilata, s čimer bi se vzdrževalo konstanto razmerje med salicilatom in PAS. To je mogoče le do neke meje oziroma sposobnosti kompenzacije, nakar bi pričakovali

koncentracijsko odvisno inhibicijo. To smo v poskusih tudi opazili, saj se je inhibicija s PAS začela dvigati pri višjih koncentracijah PAS. Glede na to, da ima MAP okvarjeno sintezo mikobaktina, bi pričakovali, da bi imel PAS manjši efekt na viabilnost MAP kot na MAH, ali pa ga sploh ne bi imel. Nasprotno smo pri MAP 468/09 opazili zelo močno inhibicijo. To pomeni, da mora obstajati alternativna tarča za PAS, ki je specifično občutljiva v pomanjkanju železa. Nekaj študij navaja možno regulatorno vlogo salicilata pri mikobakterijah, vendar zaenkrat ni znano katere procese naj bi reguliral in kako so povezani z metabolizmom železa (Adilakshmi in sod., 2000). V tem primeru, bi PAS kot analog salicilata, lahko imel pomembno vlogo kot kompetitivni inhibitor. Dejstvo je, da mikobakterije v pogojih pomanjkanja železa proizvajajo večje količine salicilata. Vloga te produkcije ni znana, vsekakor nakazuje na dodatno vlogo salicilata, poleg prekurzorja za sintezo mikobaktina. Opazili so, da se nivoji produkcije salicilata razlikujejo med vrstami mikobakterij (Ratledge in Winder, 1962). Prav tako se razlikuje tudi občutljivost na PAS (Adilakshmi in sod., 2000). *M. smegmatis*, ki proizvaja precej višje količine salicilata kot *M. tuberculosis*, je tudi manj občutljiva na PAS. To pomeni da na občutljivost na PAS vsaj delno vpliva sposobnost produkcije salicilata. Zanimivo je, da tudi sam salicilat kaže inhibitorno aktivnost na obe bakteriji in je podobna inhibiciji s PAS, le da enako inhibicijo doseže pri precej višjih koncentracijah. Glede na to, da mikobakterije že same proizvajajo salicilat, predvidevamo, da gre v tem primeru prej za generalno preobremenjenost sistema z salicilatom.

Vse to kaže, da ima okvara v sintezi mikobaktina pri MAP 468/09 vpliv na homeostazo železa, ki nadalje vpliva na odpornost MAP na antibiotike. Kohanski in sodelavci (2007) so pokazali, da je toksičnost večine baktericidnih antibiotikov vsaj delno posledica kopičenja superoksidnih radikalov, ki lahko porušijo homeostazo železa. V primeru, da celica s svojimi mehanizmi ni kompetentna za ohranjanje homeostaze železa, se hitreje poruši tudi redoks ravnotežje, kar vodi do večje občutljivosti na perturbacije iz okolice. Predvidevamo, da je tako tudi v primeru MAP. Vsekakor moramo poudariti, da smo v okviru naše raziskave uspeli izvesti poskus le na enem sevu MAP in MAH. Za boljše razumevanje vpliva pomanjkanje železa na odpornost na antibiotike bi bilo potrebno preveriti relacije še pri dodatnih sevih.

5.2 SKLEPI

V operonih za sintezo mikobaktina smo pri različnih sevih MAP ugotovili akumulacijo več nesmiselnih mutacij v primerjavi z operoni pri MAH in MAA. Mutacije se razlikujejo med posameznimi tipi MAP, zato najverjetneje ni enotnega genetskega vzroka za okvaro v sintezi mikobaktina pri MAP v primerjavi z MAH in MAA. Zaradi degenerativne evolucije predvidevamo, da *mbt* operoni niso potrebni za preživetje MAP. Ker pa so ohranjeni sistemi za privzem mikobaktina, predvidevamo da je eksogeni mikobaktin eden izmed virov železa tudi v naravnem okolju MAP.

Kljub številnim mutacijam smo zaznali izražanje vseh genov *mbt* operona pri govejem sevu MAP tipa II. Ravni transkriptov *mbt* genov so bile precej višje, ravni *bfrA* gena pa precej nižje pri MAP kot pri MAH. Sklepamo, da je zaradi okvare v sintezi mikobaktina motena oskrba z železom, kar se kaže v povišani aktivnosti IdeR reguliranih genov. Gen *mbtA* je kazal nižje ravni transkriptov v primerjavi z ostalimi geni in nesorazmerno nižjo odzivnost ob pomanjkanju železa. Potrjujemo, da je *mbtA* možen kandidat za okvaro v sintezi mikobaktina pri MAP govejega tipa II.

Kmetije s primeri paratuberkuloze kažejo visoko kontaminacijo širše in ožje okolice z MAP. Glavni vir kontaminacije je feces okuženih živali, ki se zaradi proste paše goveda prenaša na okolico. Spiranje kontaminirane površine povzroča tudi kontaminacijo širšega okolja, ki ni neposredno v stiku z okuženimi živalmi, kot so okoliški vodotoki in delovne površine v okolici kmetije. Izredna sezonska stabilnost ravni kontaminacije kaže na veliko perzistenco MAP v okolju.

Na analiziranih kmetijah smo sočasno zaznali tudi prisotnost IS*1245*, značilno za sorodne podvrste MAA, MAH in MAS. Rezultati so pokazali signifikantno povezavo med prisotnostjo MAP in IS*1245*. Sočasna prisotnost drugih podvrst bakterije *M. avium* nakazuje na možne interakcije z MAP, tudi v smislu zagotavljanja sideroforov.

Na kmetiji smo zaznali prisotnost več vrst ameb, med drugim *Acanthamoebe sp*. in *Hartmannelle sp*., ki sta znani gostiteljici MAP in drugih mikobakterij. MAP je bila odporna na fagocitozo obeh rodov ameb in predvidevamo, da intracelularna lokacija vsaj delu populacije MAP omogoča daljšo perzistenco v okolju. Predvidevamo, da okolje amebe omogoča MAP pridobivanje železa iz podobnih virov kot v gostiteljevih makrofagih, brez potrebe po sintezi lastnih sideroforov.

Dostopnost železa vpliva na odpornost na antibiotike pri podvrstah bakterije *M. avium*. Pri MAH se to kaže v povišani kot tudi znižani odpornosti na različne razrede antibiotikov. V nasprotnem primeru je MAP ob pomanjkanju železa bolj občutljiva na večino testiranih antibiotikov. Predvidevamo, da je to posledica znižane sposobnosti ohranjanja homeostaze železa in posledično redoks neravnovesja, delno zaradi okvare v sintezi sideroforov.

V naši raziskavi smo pokazali, da je odsotnost sinteze mikobaktina posledica degenerativne evolucije *mbt* operonov, kar pomeni, da sinteza lastnega mikobaktina ni nujna za preživetje bakterij podvrste MAP. Za vzdrževanje homeostaze železa pri bakterijah podvrste MAP je zato potreben obstoj alternativnih možnosti privzema železa. Glede na to, da ima MAP ohranjeno sposobnost privzema mikobaktina, predvidevamo, da je eksogeni mikobaktin iz sorodnih podvrst *M. avium* pomemben vir železa za bakterije podvrste MAP tudi v *in vivo* pogojih. To podpirajo tudi naše raziskave, kjer smo ugotovili soodvisnost med prisotnostjo MAP in drugih podvrst *M. avium* v okolju izven gostitelja. Tesen kontakt, potreben za izmenjavo mikobaktina med bakterijami podvrste MAP in

ostalimi podvrstami *M. avium* v okolju, je omogočen v biofilmih in amebah. V gostitelju je privzem železa preko eksogenega mikobaktina možen v primeru koinfekcije z sorodnimi bakterijami podvrste *M. avium*, kar je bilo do sedaj slabo raziskano in potrebuje večjo pozornost. Po drugi strani degenerativna evolucija *mbt* operonov kaže na možnost, da je za vzdrževanje homeostaze železa v gostitelju ali v amebah dogovoren nek drug, od mikobaktina neodvisen mehanizem za privzem železa. Identifikacija takšnega mehanizma bi bila izrednega pomena za boljše razumevanje patogeneze in vloge železa pri infekciji človeka z drugimi patogenimi mikobakterijami, kot sta bakteriji *M. tuberculosis* in *M. leprae*. Prilagoditve bakterij podvrst *M. avium* na pomanjkanje železa povzroči fenotipske spremembe, ki se med drugimi kažejo v spremenjeni odpornosti na antibiotike. Ugotovili smo, da to lahko prispeva k slabi korelaciji med *in vitro* določeno občutljivostjo na antibiotike in občutljivostjo *in vivo*, kjer so mikobakterije med drugim izpostavljene pomanjkanju železa. To je pomembna ugotovitev za izboljšanje zdravljenja okužb s temi bakterijami in izboljšanje metod za *in vitro* določanje minimalnih inhibitornih koncentracij, še zlasti za antibiotike, ki delujejo na mehanizme privzema železa ali pa so njihove tarče regulirane z železom.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Homeostaza železa je eden temeljnih procesov vseh živih bitij. Železo je kot katalizator potrebno za delovanje številnih encimov v bakterijski celici, hkrati je pomembno pri uravnavanju redoks ravnotežja. Zaradi slabe topnosti je v okolju težko dostopno, v gostitelju pa strogo regulirano kot del obrambnega sistema pred patogeni. Bakterije v takšnih okoljih železo pridobivajo z visoko afinitetnimi spojinami – siderofori. Pri patogenih mikobakterijah so to mikobaktini in so nujno potrebni za vzpostavitev infekcije kot tudi za kompetenco v okolju. Geni za sintezo mikobaktina so prisotni pri večini mikobakterij, kljub temu *Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis* (MAP) ne proizvaja lastnega mikobaktina in je odvisna od eksogenega vira tega siderofora. MAP je podobno kot sorodne podvrste bakterije *M. avium* intracelularni patogen, sposobna je dalj časa preživeti tudi v okolju izven gostitelja. Pri tem se postavlja vprašanje, kako MAP preživi v teh okoljih brez mikobaktina in kaj je vzrok za odsotnost lastne produkcije tega siderofora. Ker se mikobakterije srečujejo s pomanjkanjem železa tudi v gostiteljevih makrofagih, obstaja možnost, da fenotipske prilagoditve zaradi vzdrževanja homeostaze železa bistveno vplivajo na odpornost na antibiotike. Zaradi drugačnega metabolizma železa se ti vplivi lahko razlikujejo med MAP in sorodnimi podvrstami bakterije *M. avium*.

V okviru naše raziskave smo se osredotočili na iskanje molekularnih razlogov za morebitno okvaro v sintezi sideroforov pri MAP. V prvi fazi smo izvedli *in silico* primerjavo nukleotidnih zaporedij kompletnih operonov za sintezo mikobaktina med MAH in različnimi sevi MAP, in skušali identificirati kritične razlike na genetski ravni. V drugi fazi smo z Real-time kvantitativnim PCR analizirali izražanja genov *mbt* operonov pri obeh bakterijah, da bi ugotovili, če obstaja razlog na transkripcijski ravni. Nadalje smo želeli pogledati, kakšna je razširjenost in dinamika MAP v okolju ter kakšen je vpliv ameb in sorodnih mikobakterij na perzistenco MAP v okolju. V različnih časovnih obdobjih smo povzorčili okolico dveh kmetij, kjer je bila potrjena prisotnost paratuberkuloze, in preverili prisotnost MAP v vzorcih preko detekcije IS*900* z Real-time PCR. Preverili smo tudi križanje življenjskih okolij z drugimi podvrstami bakterije *M. avium* in izvedli detekcijo IS*1245*, ki je značilna za *M. avium* podvrste *hominissuis* (MAH), *avium* (MAA) in *silvaticum* (MAS). V vzorcih kmetij smo z gojitvenimi tehnikami preverili prisotnost ameb, jih izolirali in preverili njihovo interakcijo za MAP in MAH. Nazadnje smo z resazurinsko metodo preverili, kako pomanjkanje železa vpliva na odpornost na antibiotike, še zlasti pri MAP, ki ima okvarjen sistem privzema železa z mikobaktinom, in to navezali na problematiko zdravljenja okužbe s tema dvema bakterijama.

Primerjalna genomika *mbt* operonov je pokazala prisotnost več nesmiselnih mutacij v primerjavi z MAH in MAA, ki pa niso bile skupne vsem MAP tipom. Goveji sevi tipa II imajo nesmiselne mutacije v genih *mbtAEFK*, ovčji sevi tipa I v genih *mbtICEFL* in ovčji sevi tipa III v genih *mbtCEFLM*. Med podvrstami nismo zaznali pomembnejših razlik v IdeR regulatornih mestih *mbt* operonov, razen v primeru *mbtL*, kjer so vsi sevi MAP imeli substitucijo C/G na 11. mestu IdeR vezavnega mesta in 9 nt veliko delecijo 20 nt višje od IdeR mesta. Pri ovčjih sevih tipa III smo opazili kompletno delecijo enega od dveh IdeR mest v promotorju bakterioferitina *bfrA*.

Analize izražanja genov pri nizkih koncentracijah železa so pokazale precej višje ravni transkriptov vseh *mbt* genov pri MAP tipa II, razen v primeru *mbtA*, ki je bil na enaki ravni kot pri MAH 104. Nasprotno je bila raven transkriptov *bfrA* pri MAP nižja. V pogojih pomanjkanja železa smo zaznali 4-krat nižji odziv gena *mbtA* ($p<0,005$) in v manjši meri *mbtB*, medtem ko pri *mbtILK* razlik ni bilo. Inhibicija transkripcije *bfrA* je bila 4-krat višja pri MAP kot pri MAH ($p<0,05$).

Na obeh kmetijah smo ugotovili visoko stopnjo kontaminacije z MAP. Večina vzorcev je bila pozitivnih za IS*900* (79,3% kmetija A in 69,0 % kmetija B). Najbolj pogosto so bili kontaminirani vzorci, ki so vsebovali feces, enakomerno kontaminacijo smo zaznali tudi v drugih okoljskih vzorcih v ožji in širši okolici kmetije. Najvišje koncentracije MAP smo zaznali v vzorcih, ki so vsebovali feces, nesorazmerno visoke koncentracije pa tudi v vlažnih biofilmih. Kontaminacija z MAP je bila stabilna čez vse sezone in v razmahu dveh let. Na obeh kmetijah smo zaznali tudi prisotnost IS*1245* (41,4 % na kmetija A in 50 % na kmetiji B), ki je bila signifikantno povezana s prisotnostjo IS900 ($p=0,0017$). Na obeh kmetijah smo izolirali več vrst ameb, med drugim *Acanthamoebe sp*., *Hartmannelle sp*. in pokazali, da sta MAP in MAH odporni na fagocitozo s temi amebami.

Profili odpornosti na antibiotike so se signifikantno spremenili v odziv na pomanjkanje železa pri obeh bakterijah. MAH 104 je pri nizkih koncentracijah železa kazala signifikantno ($p<0,05$) višjo odpornost na 6-merkaptopurin in azitromicin, ter nižjo odpornost na isoniazid, etambutol, D-cikloserin in 4-aminosalicilat. Pri MAP 468/09 je rast v nizkih koncentracijah železa povzročila povečano občutljivost za večino testiranih antibiotikov, z izjemo isoniazida in ampicilina.

Opažena akumulacija nesmiselnih mutacij v *mbt* operonih pri vseh sevih MAP kaže na degenerativno evolucijo, zaradi česar predvidevamo, da sinteza mikobaktina ni potrebna za preživetje MAP. Pri analiziranem sevu MAP tipa II je transkripcijska aktivnost *mbt* operonov ohranjena in kaže odzivnost na pomanjkanje železa. Nižji odziv *mbtA* v primerjavi z ostalimi geni in odzivom *mbtA* pri MAH 104 nakazuje na možno vlogo tega gena pri okvari sinteze mikobaktina pri MAP tipa II. Predvidevamo, da je v primeru MAP ohranjanje transkripcijske aktivnosti nefunkcionalnega operona posledica neoptimiziranega genoma na poti evolucije iz okoljske v specializirano patogeno bakterijo.

Na podlagi naših rezultatov sklepamo, da MAP v okolju izven gostitelja interagira s sorodnimi podvrstami bakterije *M. avium*. To ji omogoča, da koristi kompatibilne eksogene vire železa in tako zaobide potrebo po lastni sintezi mikobaktina. Po drugi strani v okolju interagira z amebami, katerih intracelularno okolje omogoča MAP alternativen način pridobivanja železa in dolgoročno perzistenco izven gostitelja.

Spremenjeni profili odpornosti na antibiotike v pogojih pomanjkanja železa pri obeh bakterijah imajo pomembne implikacije za zdravljenje infekcij s temi patogeni. Povišane odpornosti na nekatere antibiotike lahko pomenijo neučinkovito zdravljenje ali celo razvoj rezistence. Po drugi strani znižane odpornosti na nekatere antibiotike pomenijo potencialno večjo učinkovitost takšnih antibiotikov *in vivo* kot določeno *in vitro*, saj so mikobakterije *in vivo* izpostavljene pomanjkanju železa. Vsekakor bi bilo potrebno za *in vitro* določevanje MIC za antibiotike, ki interferirajo z metabolizmom železa, uporabljati gojišča z omejenimi količinami železa.

6.2 SUMMARY

Iron homeostasis is one of elementary processes common to all living beings. Iron is an important cofactor of many enzymatic reactions in bacteria and is also tightly involved in the redox balance of the cell. Poor solubility in water contributes to low availability of iron in the environment. Access to iron in the host is restricted as a part of defense mechanism against pathogens. In such environments, bacteria gain access to iron by utilizing high affinity iron chelators – siderophores. In pathogenic mycobacteria production of siderophores – mycobactins – is crucial for successful infection in the host as well as for competence in the environment outside the host. Although genes for mycobactin synthesis are conserved among most mycobacteria, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) does not produce its own mycobactin and depends on exogenous sources of this siderophore. As other *M. avium* subspecies, MAP is an intracellular pathogen, capable of long-term persistence outside the host. It is intriguing how MAP survives in these environments without its own mycobactin and what is the underlying cause for lack of mycobactin production in this bacterium. Since mycobacteria are exposed to low iron conditions in macrophages of the host during infection, the phenotypic adaptations to sustain iron homeostasis could influence the susceptibility of mycobacteria to antibiotics. Due to altered iron metabolism of MAP in terms of siderophore production, these influences could significantly differ in respect to other *M. avium* subspecies.

In the course of our study we focused on identifying a molecular cause that might account for the lack of mycobactin biosynthesis in MAP. First we aligned and compared the mycobactin synthesis operons (*mbt* operons) of different *M. avium* subspecies with *in silico* comparative genomics methods and tried to resolve a potential cause on the genetic level. Next we compared the expression of *mbt* operons between MAH and MAP with qPCR, to see if the cause exists on the level of transcription. Next we determined the distribution and dynamics of MAP in the environment and what is the role of amoeba in environmental persistence of MAP. We sampled the environment of two farms with a history of Johne's disease in different seasons during a period of two years. Samples were analyzed with quantitative Real-time PCR for presence of MAP specific marker IS*900*. Detection of IS*1245* (specific for *M. avium* ssp. *hominissuis* (MAH) *and avium (*MAA)) was also carried out, to see if the environment of MAP is shared with other *M. avium* subspecies. Amoebas were isolated form environmental samples and their interaction with mycobacteria analyzed with classic microbiological methods. Finally, we determined the effect of low iron availability on antibiotic susceptibility of MAH and MAP using the resazurin method and discussed our findings in the view of antibiotic treatment of infections with these bacteria.

Comparative genomics of *mbt* operons showed the presence of a number of nonsense mutations in MAP compared to MAH and MAA, which were not common to all MAP types. Bovine type II strains have nonsense mutations in genes *mbtAEFK*, ovine type I strains in genes *mbtICEFL* and ovine type III strains in genes *mbtCEFLM*. No significant differences in IdeR regulatory sites in *mbt* operons were identified between subspecies, except at IdeR before *mbtL*, where all of the MAP strains contain a substitution C/G at base 11 in IdeR binding box and 9 base deletion 20 bases upstream of IdeR box. Ovine type III strains have a complete deletion of one of two IdeR binding sites in the promoter region of *bfrA*.

Gene expression analysis in low iron conditions showed higher transcript levels for most of the genes of mbt operons in MAP type II, except for *mbtA*, which was at a comparable level in MAH. In contrast level of *bfrA* transcripts in low iron conditions was much lower at MAP than MAH. Induction of *mbtA* in low iron conditions was 4-fold lower ($p<0,005$) in MAP than MAH while no significant differences were observed between induction of *mbtBIKL*. Inhibition of transcription from *bfrA* in low iron was 4-fold higher ($p<0,05$) in MAP than in MAH.

Our results show high level of environmental contamination with MAP on both farms. Most of the samples were positive for IS*900* (79,3 % for farm A and 69,0 % for farm B). IS*900* was most frequently detected in faecally contaminated samples, although other environmental samples also showed a steady and equal distribution of IS*900*. Highest IS*900* copy numbers were detected in faecally contaminated samples, unproportionatelly high numbers were also detected in damp biofilms. Environmental contamination with MAP was stable during all seasonal samplings for a period of two years. Presence of IS*1245* was also detected in samples from both farms (41,4 % on farm A and 50,0 % on farm B), and was significantly correlated with the presence of IS900 ($p=0,0017$). *Acanthamoeba sp.* and *Hartmannella sp.* were isolated from samples of both farms and our experiments showed that both MAH and MAP are resistant to grazing by these amoeba.

Antibiotic susceptibility profiles were significantly altered in response to low iron conditions in both MAP and MAH. MAH 104 showed lower susceptibility 6-mercaptopurine and azithromycin and higher susceptibility isoniazid, ethambutol, D-cycloserine and 4-aminosalicylate in low iron conditions ($p<0,05$). MAP 468/09 showed hyper-susceptibility in low iron conditions for most of the drugs tested, with the exception of isoniazid and ampicillin.

From our results we conclude that observed accumulation of nonsense mutations in *mbt* operons of all MAP types shows for a degenerative evolution, which indicates that synthesis of mycobactin is not needed for survival of MAP. However, *mbt* operon of analyzed MAP type II is transcriptionally active and shows iron dependent response. Lower response of mbtA compared to other genes and response of this gene in MAH 104 shows for a possible role of this gene in failure of mycobactin synthesis in MAP type II. We propose that sustaining transcription of a nonfunctional operon in MAP type II is a consequence of a non-optimized genome on an evolutionary path from an environmental bacterium to a specialized pathogen.

In the environment outside the host, MAP interacts with other M. avium subspecies. This enables MAP to exploit compatible exogenous iron sources which allows it to circumvent the need for synthesis of mycobactin. Additionally, interaction of MAP with amoeba and intracellular lifestyle enables MAP alternative way of iron acquisition and long-term persistence outside the host.

Altered antibiotic susceptibility profiles of MAP and MAH in response to low iron conditions have important implications in the treatment of infections with these pathogens. Lower susceptibility to some antibiotics could mean lower treatment efficiency or even development of resistance. On the contrary, higher susceptibility for other antibiotics could mean that the efficiency *in vivo* might be better than *in vitro*, since mycobacteria are exposed to low iron conditions *in viv*o. Importantly, *in vitro* antibiotic susceptibility testing for antibiotics, that interfere with iron metabolism, should be carried out in media with low iron concentrations.

7 VIRI

Adekambi T., Ben Salah S., Khlif M., Raoult D., Drancourt M. 2006. Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. Applied and Environmental Microbiology, 72, 9: 5974-5981

Adilakshmi T., Ayling P. D., Ratledge C. 2000. Mutational analysis of a role for salicylic acid in iron metabolism of *Mycobacterium smegmatis*. Journal of Bacteriology, 182, 2: 264-271

Adúriz J. J., Juste R. A., Cortabarria N. 1995. Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. Veterinary Microbiology, 45, 2–3: 211-217

Agranoff D., Monahan I. M., Mangan J. A., Butcher P. D., Krishna S. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the Nramp family. Journal of Experimental Medicine, 190, 5: 717-724

Alexander D. C., Turenne C. Y., Behr M. A. 2009. Insertion and deletion events that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Journal of Bacteriology, 191, 3: 1018-1025

Anderson J. L., Meece J. K., Koziczkowski J. J., Clark D. L., Radcliff R. P., Nolden C. A., Samuel M. D., Ellingson J. L. E. 2007. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in scavenging mammals in Wisconsin. Journal of Wildlife Diseases, 43, 2: 302-308

Andrews S. C., Robinson A. K., Rodríguez-Quiñones F. 2003. Bacterial iron homeostasis. FEMS Microbiology Reviews, 27, 2-3: 215-237

Appelberg R. 2006. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* infection. Immunologic Research, 35, 3: 179-190

Appelberg R., Castro A. G., Pedrosa J., Silva R. A., Orme I. M., Minóprio P. 1994. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha during T-cell-independent and -dependent phases of *Mycobacterium avium* infection. Infection and Immunity, 62, 9: 3962-3971

Archuleta R. J., Yvonne Hoppes P., Primm T. P. 2005. *Mycobacterium avium* enters a state of metabolic dormancy in response to starvation. Tuberculosis, 85, 3: 147-158

Autschbach F., Eisold S., Hinz U., Zinser S., Linnebacher M., Giese T., Löffler T., Büchler M. W., Schmidt J. 2005. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS*900* DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. Gut, 54, 7: 944-949

Bacon J., Dover L. G., Hatch K. A., Zhang Y., Gomes J. M., Kendal S., Wernisch L., Stoker N. G., Butcher P. D., Besra G. S., Marsh P. D. 2007. Lipid composition and transcriptional response of *Mycobacterium tuberculosis* grown under iron-limitation in continuous culture: identification of a novel wax ester. Microbiology, 153, 5: 1435-1444

Baek S. H., Li A. H., Sassetti C. M. 2011. Metabolic regulation of mycobacterial growth and antibiotic sensitivity. PLoS Biology, 9, 5: e1001065

Banerjee S., Nandyala A. K., Raviprasad P., Ahmed N., Hasnain S. E. 2007. Iron-dependent RNA-binding activity of *Mycobacterium tuberculosis* aconitase. Journal of Bacteriology, 189, 11: 4046-4052

Bannantine J., Wu C. W., Hsu C., Zhou S., Schwartz D., Bayles D., Paustian M., Alt D., Sreevatsan S., Kapur V., Talaat A. 2012. Genome sequencing of ovine isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* offers insights into host association. BMC Genomics, 13, 1: 89, doi:10.1186/1471-2164-1113-1189

Barclay R., Ratledge C. 1983. Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. Journal of Bacteriology, 153, 3: 1138-1146

Bartos M., Hlozek P., Svastova P., Dvorska L., Bull T., Matlova L., Parmova I., Kuhn I., Stubbs J., Moravkova M., Kintr J., Beran V., Melicharek I., Ocepek M., Pavlik I. 2006. Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS*900*, IS*901*, IS*1245* and IS*901*-flanking region PCR with internal standards. Journal of Microbiological Methods, 64, 3: 333-345

Basler T., Geffers R., Weiss S., Valentin-Weigand P., Goethe R. 2008. *Mycobacterium avium* subspecies induce differential expression of pro-inflammatory mediators in a murine macrophage model: Evidence for enhanced pathogenicity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Immunobiology, 213, 9–10: 879-888

Behr M. A., Collins D. M. 2010 Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Oxfordshire, CABI: 392 str.

Behr M. A., Kapur V. 2008. The evidence for *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease. Current Opinion in Gastroenterology, 24, 1: 17-21

Bellamy R. 2003. Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics. Genes and Immunity, 4, 1: 4-11

Ben Salah I., Drancourt M. 2010. Surviving within the amoebal exocyst: the *Mycobacterium avium* complex paradigm. BMC Microbiology, 10, 1: 99, doi:10.1186/1471-2180-1110-1199

Bermudez L. E., Petrofsky M., Sommer S., Barletta R. G. 2010. Peyer's patch-deficient mice demonstrate that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* translocates across the mucosal barrier via both M cells and enterocytes but has inefficient dissemination. Infection and Immunity, 78, 8: 3570-3577

Bermudez L. E., Young L. S., Enkel H. 1991. Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human macrophages: roles of membrane receptors and serum proteins. Infection and Immunity, 59, 5: 1697-1702

Beumer A., King D., Donohue M., Mistry J., Covert T., Pfaller S. 2010. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in drinking water and biofilms by quantitative PCR. Applied and Environmental Microbiology, 76, 21: 7367-7370

Blumenthal A., Lauber J., Hoffmann R., Ernst M., Keller C., Buer J., Ehlers S., Reiling N. 2005. Common and unique gene expression signatures of human macrophages in response to four strains of *Mycobacterium avium* that differ in their growth and persistence characteristics. Infection and Immunity, 73, 6: 3330-3341

Boechat N., Lagier-Roger B., Petit S., Bordat Y., Rauzier J., Hance A. J., Gicquel B., Reyrat J.-M. 2002. Disruption of the gene homologous to mammalian Nramp1 in *Mycobacterium tuberculosis* does not affect virulence in mice. Infection and Immunity, 70, 8: 4124-4131

Boukhalfa H., Crumbliss A. 2002. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. Biometals, 15, 4: 325-339

Boyer M., Yutin N., Pagnier I., Barrassi L., Fournous G., Espinosa L., Robert C., Azza S., Sun S., Rossmann M. G., Suzan-Monti M., La Scola B., Koonin E. V., Raoult D. 2009. Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106, 51: 21848-21853

Brennan P. J., Nikaido H. 1995. The envelope of mycobacteria. Annual Review of Biochemistry, 64, 1: 29-63

Brown K. A., Ratledge C. 1975. The effect of p-aminosalicyclic acid on iron transport and assimilation in mycobacteria. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 385, 2: 207-220

Bruijnesteijn van Coppenraet L., de Haas P., Lindeboom J., Kuijper E., van Soolingen D. 2008. Lymphadenitis in children is caused by *Mycobacterium avium hominissuis* and not related to 'bird tuberculosis'. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 27, 4: 293-299

Bull T. J., Hermon-Taylor J., Pavlik I., El-Zaatari F., Tizard M. 2000. Characterization of IS*900* loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. Microbiology, 146, 9: 2185-2197

Bull T. J., McMinn E. J., Sidi-Boumedine K., Skull A., Durkin D., Neild P., Rhodes G., Pickup R., Hermon-Taylor J. 2003. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. Journal of Clinical Microbiology, 41, 7: 2915-2923

Campora L., Corazza M., Zullino C., Ebani V. V., Abramo F. 2011. *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* disseminated infection in a Basset Hound dog. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 23, 5: 1083-1087

Cangelosi G. A., Do J. S., Freeman R., Bennett J. G., Semret M., Behr M. A. 2006. The two-component regulatory system mtrAB is required for morphotypic multidrug resistance in Mycobacterium avium. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50, 2: 461-468

Carrondo M. A. 2003. Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint. EMBO Journal, 22, 9: 1959-1968

Castellanos E., Aranaz A., de Juan L., Álvarez J., Rodríguez S., Romero B., Bezos J., Stevenson K., Mateos A., Domínguez L. 2009a. Single nucleotide polymorphisms in the IS*900* sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* are strain type specific. Journal of Clinical Microbiology, 47, 7: 2260-2264

Castellanos E., Aranaz A., Gould K. A., Linedale R., Stevenson K., Alvarez J., Dominguez L., de Juan L., Hinds J., Bull T. J. 2009b. Discovery of stable and variable differences in the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III genomes by pan-genome microarray analysis. Applied and Environmental Microbiology, 75, 3: 676-686

Castellanos E., Aranaz A., Romero B., de Juan L., Alvarez J., Bezos J., Rodríguez S., Stevenson K., Mateos A., Domínguez L. 2007. Polymorphisms in *gyrA* and *gyrB* genes among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III isolates. Journal of Clinical Microbiology, 45, 10: 3439-3442

Cegnar T. 2011a. Podnebne razmere v juliju 2011. Naše okolje, 18, 7: 3-22

Cegnar T. 2011b. Podnebne razmere v novembru 2011. Naše okolje, 18, 11: 3-24

Cegnar T., Gorup T. 2010a. Podnebne razmere v juliju 2010. Naše okolje, 17, 7: 3-22

Cegnar T., Gorup T. 2010b. Podnebne razmere v maju 2010. Naše okolje, 17, 5: 3-22

Chakraborty S., Gruber T., Barry C. E., Boshoff H. I., Rhee K. Y. 2013. Para-aminosalicylic acid acts as an alternative substrate of folate metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. Science, 339, 6115: 88-91

Chavadi S. S., Stirrett K. L., Edupuganti U. R., Vergnolle O., Sadhanandan G., Marchiano E., Martin C., Qiu W.-G., Soll C. E., Quadri L. E. N. 2011. Mutational and phylogenetic analyses of the mycobacterial *mbt* gene cluster. Journal of Bacteriology, 193, 21: 5905-5913

Chiodini R. J. 1993. Abolish *Mycobacterium paratuberculosis* strain 18. Journal of Clinical Microbiology, 31, 7: 1956-1958

Chiodini R. J. 1990. Bactericidal activities of various antimicrobial agents against human and animal isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 34, 2: 366-367

Chipperfield J., Ratledge C. 2000. Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. Biometals, 13, 2: 165-168

Chomczynski P., Sacchi N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nature Protocols, 1, 2: 581-585

Chou C. J., Wisedchaisri G., Monfeli R. R., Oram D. M., Holmes R. K., Hol W. G. J., Beeson C. 2004. Functional studies of the *Mycobacterium tuberculosis* iron-dependent regulator. Journal of Biological Chemistry, 279, 51: 53554-53561

Cirillo J., Falkow S., Tompkins L., Bermudez L. 1997. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. Infection and Immunity, 65, 3759 - 3767

Clarke C. J., Little D. 1996. The pathology of ovine paratuberculosis: Gross and histological changes in the intestine and other tissues. Journal of Comparative Pathology, 114, 4: 419-437

Cohen S. P., Hachler H., Levy S. B. 1993. Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic-resistance (MAR) locus in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 175, 5: 1484-1492

Cole S. T., Eiglmeier K., Parkhill J., James K. D., Thomson N. R., Wheeler P. R., Honore N., Garnier T., Churcher C., Harris D., Mungall K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R. M., Devlin K., Duthoy S., Feltwell T., Fraser A., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Lacroix C., Maclean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Quail M. A., Rajandream M. A., Rutherford K. M., Rutter S., Seeger K., Simon S., Simmonds

M., Skelton J., Squares R., Squares S., Stevens K., Taylor K., Whitehead S., Woodward J. R., Barrell B. G. 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature, 409, 6823: 1007-1011

Collins D. M., Cavaignac S., de Lisle G. W. 1997. Use of four DNA insertion sequences to characterize strains of the *Mycobacterium avium* complex isolated from animals. Molecular and Cellular Probes, 11, 5: 373-380

Collins D. M., Gabric D. M., de Lisle G. W. 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. Journal of Clinical Microbiology, 28, 7: 1591-1596

Cook K. L., Britt J. S., Bolster C. H. 2010. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in biofilms on livestock watering trough materials. Veterinary Microbiology, 141, 1–2: 103-109

Corn J. L., Manning E. J. B., Sreevatsan S., Fischer J. R. 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. Applied and Environmental Microbiology, 71, 11: 6963-6967

Cousins D. V., Williams S. N., Hope A., Eamens G. J. 2000. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using IS*900* RFLP. Australian Veterinary Journal, 78, 3: 184-190

Crowle A. J., Dahl R., Ross E., May M. H. 1991. Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. Infection and Immunity, 59, 5: 1823-1831

Dagleish M. P., Stevenson K., Foster G., McLuckie J., Sellar M., Harley J., Evans J., Brownlow A. 2012. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* Infection in a captive-bred kiang (*Equus kiang*). Journal of Comparative Pathology, 146, 4: 372-377

De Groote M. A., Pace N. R., Fulton K., Falkinham J. O. 2006. Relationships between *Mycobacterium* isolates from patients with pulmonary mycobacterial infection and potting soils. Applied and Environmental Microbiology, 72, 12: 7602-7606

De Juan L., Álvarez J., Aranaz A., Rodríguez A., Romero B., Bezos J., Mateos A., Domínguez L. 2006a. Molecular epidemiology of type I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. Veterinary Microbiology, 115, 1–3: 102-110

De Juan L., Álvarez J., Romero B., Bezos J., Castellanos E., Aranaz A., Mateos A., Domínguez L. 2006b. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. Applied and Environmental Microbiology, 72, 9: 5927-5932

De Voss J., J., Rutter K., Schroeder B. G., III C. E. B. 1999. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. Journal of Bacteriology, 181, 15: 4443-4451

De Voss J., Rutter K., Schroeder B. G., Su H., Zhu Y., III C. E. B. 2000. The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 3: 1252-1257

Doucette K., Fishman J. A. 2004. Nontuberculous mycobacterial infection in hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients. Clinical Infectious Diseases, 38, 10: 1428-1439

Dover L. G., Ratledge C. 1996. Identification of a 29 kDa protein in the envelope of *Mycobacterium smegmatis* as a putative ferri-exochelin receptor. Microbiology, 142, 6: 1521-1530

Drancourt M., Adékambi T., Raoult D. 2007. Interactions between *Mycobacterium xenopi*, amoeba and human cells. Journal of Hospital Infection, 65, 2: 138-142

Du Moulin G. C., Stottmeier K. D., Pelletier P. A., Tsang A. Y., Hedley-Whyte J. 1988. Concentration of *Mycobacterium avium* by hospital hot water systems. The Journal of the American Medical Association, 260, 11: 1599-1601

Dvorska L., Matlova L., Ayele W. Y., Fischer O. A., Amemori T., Weston R. T., Alvarez J., Beran V., Moravkova M., Pavlik I. 2007. Avian tuberculosis in naturally infected captive water

birds of the *Ardeideae* and *Threskiornithidae* families studied by serotyping, IS*901* RFLP typing, and virulence for poultry. Veterinary Microbiology, 119, 2–4: 366-374

Dvorska L., Matlova L., Bartos M., Parmova I., Bartl J., Svastova P., Bull T. J., Pavlik I. 2004. Study of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000. Veterinary Microbiology, 99, 3–4: 239-250

Dwyer D. J., Kohanski M. A., Hayete B., Collins J. J. 2007. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. Molecular Systems Biology, 3, 91, doi:10.1038/msb4100135

Eisenberg S. W. F., Koets A. P., Hoeboer J., Bouman M., Heederik D., Nielen M. 2010a. Presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples collected on commercial Dutch dairy farms. Applied and Environmental Microbiology, 76, 18: 6310-6312

Eisenberg S. W. F., Nielen M., Santema W., Houwers D. J., Heederik D., Koets A. P. 2010b. Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. Veterinary Microbiology, 143, 2–4: 284-292

Ellingson J. L. E., Anderson J. L., Koziczkowski J. J., Radcliff R. P., Sloan S. J., Allen S. E., Sullivan N. M. 2005. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. Journal of Food Protection, 68, 5: 966-972

Eltholth M. M., Marsh V. R., Van Winden S., Guitian F. J. 2009. Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. Journal of Applied Microbiology, 107, 4: 1061-1071

Emery D. L., Whittington R. J. 2004. An evaluation of mycophage therapy, chemotherapy and vaccination for control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. Veterinary Microbiology, 104, 3–4: 143-155

Ernst J. D. 1998. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity, 66, 4: 1277-1281

Falkinham J. O. 2003. The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. Can J Infect Dis, 14, 5: 281-286

Falkinham J. O., 3rd, Iseman M. D., de Haas P., van Soolingen D. 2008. *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease. Journal of Water and Health, 6, 2: 209-213

Feazel L. M., Baumgartner L. K., Peterson K. L., Frank D. N., Harris J. K., Pace N. R. 2009. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106, 38: 16393-16399

Felnagle E. A., Barkei J. J., Park H., Podevels A. M., McMahon M. D., Drott D. W., Thomas M. G. 2010. MbtH-Like proteins as integral components of bacterial nonribosomal peptide synthetases. Biochemistry, 49, 41: 8815-8817

Fischer O. A., Matlova L., Bartl J., Dvorska L., Svastova P., du Maine R., Melicharek I., Bartos M., Pavlik I. 2003. Earthworms (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) and mycobacteria. Veterinary Microbiology, 91, 4: 325-338

Fittipaldi M., Codony F., Adrados B., Camper A., Morató J. 2011. Viable real-time PCR in environmental samples: Can all data be interpreted directly? Microbial Ecology, 61, 1: 7-12

Flemming H. C. 2011. The perfect slime. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 86, 2: 251-259

Flemming H. C., Neu T. R., Wozniak D. J. 2007. The EPS matrix: The "house of biofilm cells". Journal of Bacteriology, 189, 22: 7945-7947

Flores A. R., Parsons L. M., Pavelka M. S. 2005. Genetic analysis of the beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics. Microbiology, 151, 521-532

Folwaczny C., Glas J., Török H. P. 2003. Crohn's disease: an immunodeficiency? European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 15, 6: 621-626

Gangaidzo I. T., Moyo V. M., Mvundura E., Aggrey G., Murphree N. L., Khumalo H., Saungweme T., Kasvosve I., Gomo Z. A. R., Rouault T., Boelaert J. R., Gordeuk V. R. 2001.

Association of pulmonary tuberculosis with increased dietary iron. Journal of Infectious Diseases, 184, 7: 936-939

Gao A., Mutharia L., Chen S., Rahn K., Odumeru J. 2002. Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. Journal of Dairy Science, 85, 12: 3198-3205

Gardner R. A., Ghobrial G., Naser S. A., Phanstiel 2004. Synthesis and biological evaluation of new acinetoferrin homologues for use as iron transport probes in mycobacteria. Journal of Medicinal Chemistry, 47, 20: 4933-4940

George K. L., Parker B. C., Gruft H., Falkinham J. O. 1980. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. II. Growth and survival in natural waters. The American review of respiratory disease, 122, 1: 89-94

Ghadiali A. H., Strother M., Naser S. A., Manning E. J. B., Sreevatsan S. 2004. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from Crohn's disease patients and animal species exhibit similar polymorphic locus patterns. Journal of Clinical Microbiology, 42, 11: 5345-5348

Glawischnig W., Steineck T., Spergser J. 2006. Infections caused by *Mycobacterium avium* subspecies *avium*, *hominissuis*, and *paratuberculosis* in free-ranging Red deer (*Cervus elaphus hippelaphus*) in Austria, 2001-2004. Journal of Wildlife Diseases, 42, 4: 724-731

Gobin J., Horwitz M. A. 1996. Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in the *M. tuberculosis* cell wall. The Journal of Experimental Medicine, 183, 4: 1527-1532

Gobin J., Moore C. H., Reeve J. R., Wong D. K., Gibson B. W., Horwitz M. A. 1995. Iron acquisition by *Mycobacterium tuberculosis*: isolation and characterization of a family of iron-binding exochelins. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92, 11: 5189-5193

Gold B., Rodriguez G. M., Marras S. A. E., Pentecost M., Smith I. 2001. The *Mycobacterium tuberculosis* IdeR is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages. Molecular Microbiology, 42, 3: 851-865

Greub G., Raoult D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. Clinical Microbiology Reviews, 17, 2: 413 - 433

Gryseels S., Amissah D., Durnez L., Vandelannoote K., Leirs H., De Jonckheere J., Silva M. T., Portaels F., Ablordey A., Eddyani M. 2012. Amoebae as potential environmental hosts for *Mycobacterium ulcerans* and other mycobacteria, but doubtful actors in Buruli ulcer epidemiology. PLoS Neglected Tropical Diseases, 6, 8: e1764

Guérin I., de Chastellier C. 2000. Disruption of the actin filament network affects delivery of endocytic contents marker to phagosomes with early endosome characteristics: The case of phagosomes with pathogenic mycobacteria. European Journal of Cell Biology, 79, 10: 735-749

Guerinot M. L. 1994. Microbial iron transport. Annual Review of Microbiology, 48, 1: 743-772

Guerrero C., Bernasconi C., Burki D., Bodmer T., Telenti A. 1995. A novel insertion element from *Mycobacterium-avium*, IS*1245*, is specific target for analysis of strain relatedness. Journal of Clinical Microbiology, 33, 2: 304-307

Guo H., Naser S. A., Ghobrial G., Phanstiel 2002. Synthesis and biological evaluation of new citrate-based siderophores as potential probes for the mechanism of iron uptake in mycobacteria. Journal of Medicinal Chemistry, 45, 10: 2056-2063

Hagedorn M., Rohde K. H., Russell D. G., Soldati T. 2009. Infection by tubercular mycobacteria is spread by nonlytic ejection from their amoeba hosts. Science, 323, 5922: 1729-1733

Hall R. M., Sritharan M., Messenger A. J. M., Ratledge C. 1987. Iron transport in *Mycobacterium smegmatis*: Occurrence of iron-regulated envelope proteins as potential receptors for iron uptake. Journal of General Microbiology, 133, 8: 2107-2114

Hänsch H. C. R., Smith D. A., Mielke M. E. A., Hahn H., Bancroft G. J., Ehlers S. 1996. Mechanisms of granuloma formation in murine *Mycobacterium avium* infection: the contribution of CD4+ T cells. International Immunology, 8, 8: 1299-1310

Harb O. S., Gao L.-Y., Kwaik Y. A. 2000. From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. Environmental Microbiology, 2, 3: 251-265

Harrington J., Crumbliss A. 2009. The redox hypothesis in siderophore-mediated iron uptake. Biometals, 22, 4: 679-689

Harris N. B., Barletta R. G. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. Clinical Microbiology Reviews, 14, 3: 489-512

Harrison A. J., Yu M., Gårdenborg T., Middleditch M., Ramsay R. J., Baker E. N., Lott J. S. 2006. The structure of MbtI from *Mycobacterium tuberculosis*, the first enzyme in the biosynthesis of the siderophore mycobactin, reveals it to be a salicylate synthase. Journal of Bacteriology, 188, 17: 6081-6091

Hayes C. S., Low D. A. 2009. Signals of growth regulation in bacteria. Current Opinion in Microbiology, 12, 6: 667-673

Herthnek D., Bolske G. 2006. New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. BMC Microbiology, 6, 1: 87, doi:10.1186/1471-2180-1186-1187

Horan K. L., Freeman R., Weigel K., Semret M., Pfaller S., Covert T. C., Soolingen D. v., Leao S. C., Behr M. A., Cangelosi G. A. 2006. Isolation of the genome sequence strain *Mycobacterium avium* 104 from multiple patients over a 17-year period. Journal of Clinical Microbiology, 44, 3: 783-789

Horsburgh C. R. 1991. Current concepts - *Mycobacterium-avium* complex infection in the Acquired-immunodeficiency-syndrome. New England Journal of Medicine, 324, 19: 1332-1338

Horsburgh C. R. 1999. The pathophysiology of disseminated *Mycobacterium avium* complex disease in AIDS. Journal of Infectious Diseases, 179, Supplement 3: S461-S465

Horsburgh C. R., Metchock B., Gordon S. M., Havlik J. A., McGowan J. E., Thompson S. E. 1994. Predictors of survival in patients with AIDS and disseminated *Mycobacterium-avium* complex disease. Journal of Infectious Diseases, 170, 3: 573-577

Hou J. Y., Graham J. E., Clark-Curtis J. E. 2002. *Mycobacterium avium* genes expressed during growth in human macrophages detected by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). Infection and Immunity, 70, 7: 3714-3726

Hughes V., Smith S., Garcia-Sanchez A., Sales J., Stevenson K. 2007. Proteomic comparison of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* grown in vitro and isolated from clinical cases of ovine paratuberculosis. Microbiology, 153, 1: 196-206

Iivanainen E. K., Martikainen P. J., Väänänen P. K., Katila M.-L. 1993. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. Applied and Environmental Microbiology, 59, 2: 398-404

Ikonomopoulos J., Pavlik I., Bartos M., Svastova P., Ayele W. Y., Roubal P., Lukas J., Cook N., Gazouli M. 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech republic. Applied and Environmental Microbiology, 71, 12: 8934-8936

Inderlied C. B., Kemper C. A., Bermudez L. E. M. 1993. The *Mycobacterium-avium* complex. Clinical Microbiology Reviews, 6, 3: 266-310

Inderlied P. C. B. 1997. Microbiology and Minimum Inhibitory Concentration Testing for *Mycobacterium avium* Complex Prophylaxis. The American Journal of Medicine, 102, 5, Supplement 3: 2-10

Janagama H., il Jeong K., Kapur V., Coussens P., Sreevatsan S. 2006. Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. BMC Microbiology, 6, 1: 10, doi:10.1186/1471-2180-1186-1110

Janagama H., Lamont E., George S., Bannantine J., Xu W., Tu Z., Wells S., Schefers J., Sreevatsan S. 2010a. Primary transcriptomes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* reveal proprietary pathways in tissue and macrophages. BMC Genomics, 11, 1: 561, doi:510.1186/1471-2164-1111-1561

Janagama H., Senthilkumar, Bannantine J., Kugadas A., Jagtap P., Higgins L., Witthuhn B., Sreevatsan S. 2010b. Iron-sparing response of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* is strain dependent. BMC Microbiology, 10, 1: 268, doi:210.1186/1471-2180-1110-1268

Janagama H. K., Senthilkumar T. M. A., Bannantine J. P., Rodriguez G. M., Smith I., Paustian M. L., McGarvey J. A., Sreevatsan S. 2009. Identification and functional characterization of the iron-dependent regulator (IdeR) of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Microbiology, 155, 11: 3683-3690

Jang H. J., Nde C., Toghrol F., Bentley W. E. 2009. Microarray analysis of *Mycobacterium bovis* BCG revealed induction of iron acquisition related genes in response to hydrogen peroxide. Environmental Science & Technology, 43, 24: 9465-9472

Jarlier V., Nikaido H. 1994. Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. FEMS Microbiology Letters, 123, 1-2: 11-18

Jones C. M., Niederweis M. 2010. Role of porins in iron uptake by *Mycobacterium smegmatis*. Journal of Bacteriology, 192, 24: 6411-6417

Kabara E., Kloss C. C., Wilson M., Tempelman R. J., Sreevatsan S., Janagama H., Coussens P. M. 2010. A large-scale study of differential gene expression in monocyte-derived macrophages infected with several strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Briefings in Functional Genomics, 9, 3: 220-237

Kaevska M., Slana I., Kralik P., Reischl U., Orosova J., Holcikova A., Pavlik I. 2011. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* in neck lymph nodes of children and their environment examined by culture and triplex quantitative real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology, 49, 1: 167-172

Katila M. L., Iivanainen E., Torkko P., Kauppinen J., Martikainen P., Väänänen P. 1995. Isolation of potentially pathogenic mycobacteria in the Finnish environment. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. Supplementum, 98, 9-11

Kauker E., Rheinwald W. 1972. Studies on the occurrence of atypical mycobacteria, group 3 Runyon, in the bedding material (sawdust) and feed of swine in North Hesse. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 85, 20: 384-387

Kazda J., Pavlik I., Falkinham J. O., Hruska K. 2009 The ecology of mycobacteria: Impact on animal's and human's health. Dordrecht, Springer: 520 str.

Keyer K., Imlay J. A. 1996. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, 24: 13635-13640

Kirschner R. A., Parker B. C., Falkinham J. O. 1999. Humic and fulvic acids stimulate the growth of *Mycobacterium avium*. FEMS Microbiology Ecology, 30, 4: 327-332

Kohanski M. A., DePristo M. A., Collins J. J. 2010. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. Molecular Cell, 37, 3: 311-320

Kohanski M. A., Dwyer D. J., Hayete B., Lawrence C. A., Collins J. J. 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell, 130, 5: 797-810

Kralik P., Nocker A., Pavlik I. 2010. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment. International Journal of Food Microbiology, 141, Supplement: S80-S86

Kralik P., Slana I., Kralova A., Babak V., Whitlock R. H., Pavlik I. 2011. Development of a predictive model for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces by quantitative real time PCR. Veterinary Microbiology, 149, 1–2: 133-138

Krishna Prasad B. N., Gupta S. K. 1978. Preliminary report on the engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of axenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas (1930). Current Science, 47, 245-247

Krishnan M. Y., Manning E. J. B., Collins M. T. 2009. Comparison of three methods for susceptibility testing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to 11 antimicrobial drugs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 64: 310-316

Krithika R., Marathe U., Saxena P., Ansari M. Z., Mohanty D., Gokhale R. S. 2006. A genetic locus required for iron acquisition in *Mycobacterium tuberculosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 7: 2069-2074

Kuehnel M. P., Goethe R., Habermann A., Mueller E., Rohde M., Griffiths G., Valentin-Weigand P. 2001. Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria. Cellular Microbiology, 3, 8: 551-566

Kunze Z. M., Portaels F., McFadden J. J. 1992. Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS*901*. Journal of Clinical Microbiology, 30, 9: 2366-2372

Lahiri R., Krahenbuhl J. L. 2008. The role of free-living pathogenic amoeba in the transmission of leprosy: a proof of principle. Leprosy Review, 79, 4: 401-409

Lambrecht R. S., Collins M. T. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* factors that influence mycobactin dependence. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 15, 3: 239-246

Lamrabet O., Medie F. M., Drancourt M. 2012a. *Acanthamoeba polyphaga* enhanced growth of *Mycobacterium smegmatis*. PLoS ONE, 7, 1: e29833

Lamrabet O., Merhej V., Pontarotti P., Raoult D., Drancourt M. 2012b. The genealogic tree of mycobacteria reveals a long-standing sympatric life into free-living protozoa. PLoS ONE, 7, 4: e34754

Larsen A. B., Merkal R. S., Cutlip R. C. 1975. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. American Journal of Veterinary Research, 36, 3: 255-257

Lawrence J. G., Hendrix R. W., Casjens S. 2001. Where are the pseudogenes in bacterial genomes? Trends in Microbiology, 9, 11: 535-540

Li L., Bannantine J. P., Zhang Q., Amonsin A., May B. J., Alt D., Banerji N., Kanjilal S., Kapur V. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102, 35: 12344-12349

Lien E., Sellati T. J., Yoshimura A., Flo T. H., Rawadi G., Finberg R. W., Carroll J. D., Espevik T., Ingalls R. R., Radolf J. D., Golenbock D. T. 1999. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. Journal of Biological Chemistry, 274, 47: 33419-33425

Löbermann M., Boršo D., Hilgendorf I., Fritzsche C., Zettl U. K., Reisinger E. C. 2012. Immunization in the adult immunocompromised host. Autoimmunity Reviews, 11, 3: 212-218

Logar K., Kopinc R., Bandelj P., Staric J., Lapanje A., Ocepek M. 2012. Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in subclinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA. BMC Veterinary Research, 8, 1: 49, doi:10.1186/1746-6148-1188-1149

Lombard J. E., Garry F. B., McCluskey B. J., Wagner B. A. 2005. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. Journal of the American Veterinary Medical Association, 227, 12: 1975-1981

Lombard J. E., Wagner B. A., Smith R. L., McCluskey B. J., Harris B. N., Payeur J. B., Garry F. B., Salman M. D. 2006. Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations. Journal of Dairy Science, 89, 11: 4163-4171

Lounis N., Maslo C., Truffot-Pernot C., Grosset J., Boelaert R. J. 2003. Impact of iron loading on the activity of isoniazid or ethambutol in the treatment of murine tuberculosis. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 7, 6: 575-579

Lumb R., Stapledon R., Scroop A., Bond P., Cunliffe D., Goodwin A., Doyle R., Bastian I. 2004. Investigation of spa pools associated with lung disorders caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompetent adults. Applied and Environmental Microbiology, 70, 8: 4906-4910

Luo M., Fadeev E. A., Groves J. T. 2005. Mycobactin-mediated iron acquisition within macrophages. Nature Chemical Biology, 1, 3: 149-153

MacCordick H. J., Schleiffer J. J., Duplatre G. 1985. Radiochemical studies on iron binding and stability of ferrimycobactin S. Radiochimica Acta, 38, 43-47

Macham L. P., Ratledge C., Nocton J. C. 1975. Extracellular iron acquisition by mycobacteria: role of the exochelins and evidence against the participation of mycobactin. Infection and Immunity, 12, 6: 1242-1251

Madigan C. A., Cheng T.-Y., Layre E., Young D. C., McConnell M. J., Debono C. A., Murry J. P., Wei J.-R., Barry C. E., Rodriguez G. M., Matsunaga I., Rubin E. J., Moody D. B. 2012. Lipidomic discovery of deoxysiderophores reveals a revised mycobactin biosynthesis pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109, 4: 1257-1262

Manabe Y. C., Hatem C. L., Kesavan A. K., Durack J., Murphy J. R. 2005. Both *Corynebacterium diphtheriae* DtxR(E177K) and *Mycobacterium tuberculosis* IdeR(D177K) are dominant positive repressors of IdeR-regulated genes in *M. tuberculosis*. Infection and Immunity, 73, 9: 5988-5994

Manabe Y. C., Saviola B. J., Sun L., Murphy J. R., Bishai W. R. 1999. Attenuation of virulence in *Mycobacterium tuberculosis* expressing a constitutively active iron repressor. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96, 22: 12844-12848

Master S., Zahrt T. C., Song J., Deretic V. 2001. Mapping of *Mycobacterium tuberculosis* katG promoters and their differential expression in infected macrophages. Journal of Bacteriology, 183, 13: 4033-4039

Matlova L., Dvorska L., Ayele W. Y., Bartos M., Amemori T., Pavlik I. 2005. Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement. Journal of Clinical Microbiology, 43, 3: 1261-1268

Matz C., Kjelleberg S. 2005. Off the hook – how bacteria survive protozoan grazing. Trends in Microbiology, 13, 7: 302-307

Matzanke B., Böhnke R., Möllmann U., Reissbrodt R., Schünemann V., Trautwein A. 1997. Iron uptake and intracellular metal transfer in mycobacteria mediated by xenosiderophores. Biometals, 10, 3: 193-203

Mba Medie F., Ben Salah I., Henrissat B., Raoult D., Drancourt M. 2011. *Mycobacterium tuberculosis* complex mycobacteria as amoeba-resistant organisms. PLoS ONE, 6, 6: e20499

McCullough W., Merkal R. 1982. Structure of mycobactin J. Current Microbiology, 7, 6: 337-341

McDermid J. M., Jaye A., Schim van der Loeff M. F., Todd J., Bates C., Austin S., Jeffries D., Awasana A. A., Whittlex H. C., Prentice A. M. 2007. Elevated iron status strongly predicts mortality in West African adults with HIV infection. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 46, 4: 498-507

Meissner G., Anz W. 1977. Sources of *Mycobacterium avium* complex infection resulting in human diseases. The American review of respiratory disease, 116, 6: 1057-1064

Mendoza J. L., San-Pedro A., Culebras E., Cies R., Taxonera C., Lana R., Urcelay E., de la Torre F., Picazo J. J., Diaz-Rubio M. 2010. High prevalence of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's disease. World Journal of Gastroenterology, 16, 36: 4558-4563

Merkal R., McCullough W. 1982. A new mycobactin: mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. Current Microbiology, 7, 6: 333-335

Messenger A. J., Hall R. M., Ratledge C. 1986. Iron uptake processes in *Mycobacterium vaccae* R877R, a mycobacterium lacking mycobactin. Journal of General Microbiology, 132, 3: 845-852

Messenger A. J., Ratledge C. 1982. Iron transport in *Mycobacterium smegmatis*: Uptake of iron from ferric citrate. Journal of Bacteriology, 149, 1: 131-135

Miethke M., Marahiel M. A. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71, 3: 413-451

Mijs W., de Haas P., Rossau R., Van der Laan T., Rigouts L., Portaels F., van Soolingen D. 2002. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 5: 1505-1518

Miltner E., Bermudez L. 2000. *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44, 1990 - 1994

Mira A., Ochman H., Moran N. A. 2001. Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. Trends in Genetics, 17, 10: 589-596

Mohagheghpour N., van Vollenhoven A., Goodman J., Bermudez L. E. 2000. Interaction of *Mycobacterium avium* with human monocyte-derived dendritic cells. Infection and Immunity, 68, 10: 5824-5829

Moliner C., Fournier P.-E., Raoult D. 2010. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. FEMS Microbiology Reviews, 34, 3: 281-294

Moloney B. J., Whittington R. J. 2008. Cross species transmission of ovine Johne's disease from sheep to cattle: an estimate of prevalence in exposed susceptible cattle. Australian Veterinary Journal, 86, 4: 117-123

Moravkova M., Babak V., Kralova A., Pavlik I., Slana I. 2012. Culture and quantitative IS*900* real-time PCR-based analysis of the persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a controlled dairy cow farm environment. Applied and Environmental Microbiology, 78, 18: 6608-6614

Moravkova M., Trcka I., Lamka J., Pavlik I. 2008. A mixed infection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. a. hominissuis* in one Red deer (*Cervus elaphus*) studied by IS*900 Bst*EII and IS*1245 Pvu*II RFLP analyses: case report. Veterinarni Medicina, 53, 8: 445-451

Motiwala A. S., Janagama H. K., Paustian M. L., Zhu X., Bannantine J. P., Kapur V., Sreevatsan S. 2006. Comparative transcriptional analysis of human macrophages exposed to animal and human Isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with diverse genotypes. Infection and Immunity, 74, 11: 6046-6056

Müller F., Aukrust P., Lien E., Haug C. J., Frøland S. S. 1998. Enhanced interleukin-10 production in response to *Mycobacterium avium* products in mononuclear cells from patients with human immunodeficiency virus infection. Journal of Infectious Diseases, 177, 3: 586-594

Mura M., Bull T. J., Evans H., Sidi-Boumedine K., McMinn L., Rhodes G., Pickup R., Hermon-Taylor J. 2006. Replication and long-term persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. Applied and Environmental Microbiology, 72, 1: 854-859

Murphy J. T., Sommer S., Kabara E. A., Verman N., Kuelbs M. A., Saama P., Halgren R., Coussens P. M. 2007. Gene expression profiling of monocyte-derived macrophages following infection with *Mycobacterium avium* subspecies *avium* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Physiological Genomics, 28, 1: 67-75

Nagachar N., Ratledge C. 2010a. Knocking out salicylate biosynthesis genes in *Mycobacterium smegmatis* induces hypersensitivity to p-aminosalicylate (PAS). FEMS Microbiology Letters, 311, 2: 193-199

Nagachar N., Ratledge C. 2010b. Roles of *trpE2*, *entC* and *entD* in salicylic acid biosynthesis in *Mycobacterium smegmatis*. FEMS Microbiology Letters, 308, 2: 159-165

Nairz M., Schroll A., Sonnweber T., Weiss G. 2010. The struggle for iron – a metal at the host–pathogen interface. Cellular Microbiology, 12, 12: 1691-1702

Nakamura K., Akama T., Bang P. D., Sekimura S., Tanigawa K., Wu H., Kawashima A., Hayashi M., Suzuki K., Ishii N. 2009. Detection of RNA expression from pseudogenes and non-coding genomic regions of *Mycobacterium leprae*. Microbial Pathogenesis, 47, 3: 183-187

Nampoothiri K. M., Rubex R., Patel A. K., Narayanan S. S., Krishna S., Das S. M., Pandey A. 2008. Molecular cloning, overexpression and biochemical characterization of hypothetical

beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Journal of Applied Microbiology, 105, 1: 59-67

Naser S. A., Ghobrial G., Romero C., Valentine J. F. 2004. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. The Lancet, 364, 9439: 1039-1044

Naser S. A., Schwartz D., Shafran I. 2000. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. American Journal of Gastroenterology, 95, 4: 1094-1095

Nguyen L., Thompson C. J. 2006. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm. Trends in Microbiology, 14, 7: 304-312

Nielsen S. S., Bjerre H., Toft N. 2008. Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. Journal of Dairy Science, 91, 12: 4610-4615

Nikitushkin V., Demina G., Shleeva M., Kaprelyants A. 2013. Peptidoglycan fragments stimulate resuscitation of "non-culturable" mycobacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 103, 1: 37-46

Nogva H. K., Dromtorp S. M., Nissen H., Rudi K. 2003. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. Biotechniques, 34, 4: 804-813

Norton C. D., LeChevallier M. W., Falkinham Iii J. O. 2004. Survival of *Mycobacterium avium* in a model distribution system. Water Research, 38, 6: 1457-1466

Nugent G., Whitford E. J., Hunnam J. C., Wilson P. R., Cross M. L., de Lisle G. W. 2011. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in wildlife on three deer farms with a history of Johne's disease. New Zealand Veterinary Journal, 59, 6: 293-298

Oh Y. K., Straubinger R. M. 1996. Intracellular fate of *Mycobacterium avium*: use of dual-label spectrofluorometry to investigate the influence of bacterial viability and opsonization on phagosomal pH and phagosome-lysosome interaction. Infection and Immunity, 64, 1: 319-325

Ojha A. K., Mukherjee T. K., Chatterji D. 2000. High intracellular level of guanosine tetraphosphate in *Mycobacterium smegmatis* changes the morphology of the bacterium. Infection and Immunity, 68, 7: 4084-4091

Olakanmi O., Schlesinger L. S., Ahmed A., Britigan B. E. 2002. Intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis* acquires iron from both extracellular transferrin and intracellular iron pools - Impact of interferon-gamma and hemochromatosis. Journal of Biological Chemistry, 277, 51: 49727-49734

Olakanmi O., Schlesinger L. S., Ahmed A., Britigan B. E. 2004. The nature of extracellular iron influences iron acquisition by *Mycobacterium tuberculosis* residing within human macrophages. Infection and Immunity, 72, 4: 2022-2028

Olakanmi O., Schlesinger L. S., Britigan B. E. 2007. Hereditary hemochromatosis results in decreased iron acquisition and growth by *Mycobacterium tuberculosis* within human macrophages. Journal of Leukocyte Biology, 81, 1: 195-204

Ott S. L., Wells S. J., Wagner B. A. 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. Preventive Veterinary Medicine, 40, 3–4: 179-192

Page F. C. 1976. An illustrated key to freshwater and soil amoebae. Ambleside, Freshwater Biological Association: 155 str.

Pallen M. J., Wren B. W. 2007. Bacterial pathogenomics. Nature, 449, 7164: 835-842

Paradkar P. N., De Domenico I., Durchfort N., Zohn I., Kaplan J., Ward D. M. 2008. Iron depletion limits intracellular bacterial growth in macrophages. Blood, 112, 3: 866-874

Parker B. C., Ford M. A., Gruft H., Falkinham J. O. 1983. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. IV. Preferential aerosolization of *Mycobacterium intracellulare* from natural waters. The American review of respiratory disease, 128, 4: 652-656

Pate M., Ocepek M., Žolnir-Dovč M., Krt B. 2005. Characterization of genetic diversity of animal and human *Mycobacterium avium* strains by IS*1245*-IS*1311* spacer typing. Veterinarni Medicina, 50, 4: 175-180

Paustian M., Zhu X., Sreevatsan S., Robbe-Austerman S., Kapur V., Bannantine J. 2008. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies obtained from multiple host species. BMC Genomics, 9, 1: 135, doi:110.1186/1471-2164-1189-1135

Pavlik I., Horvathova A., Dvorska L., Bartl J., Svastova P., du Maine R., Rychlik I. 1999. Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Journal of Microbiological Methods, 38, 1–2: 155-167

Pavlik I., Matlova L., Dvorska L., Shitaye E. J., Parmova I. 2005. Mycobacterial infections in cattle and pigs caused by *Mycobacterium avium* complex members and atypical mycobacteria in the Czech Republic during 2000–2004. Veterinarni Medicina, 50, 7: 281-290

Pickup R. W., Rhodes G., Arnott S., Sidi-Boumedine K., Bull T. J., Weightman A., Hurley M., Hermon-Taylor J. 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the river Taff in South Wales, United Kingdom, an its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. Applied and Environmental Microbiology, 71, 4: 2130-2139

Pickup R. W., Rhodes G., Bull T. J., Arnott S., Sidi-Boumedine K., Hurley M., Hermon-Taylor J. 2006. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: Diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. Applied and Environmental Microbiology, 72, 6: 4067-4077

Pickup Z. L., Pickup R., Parry J. D. 2007. A comparison of the growth and starvation responses of *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis* in the presence of suspended and attached *Escherichia coli* K12. FEMS Microbiology Ecology, 59, 3: 556-563

Pierce E. 2009a. Possible transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* through potable water: lessons from an urban cluster of Crohn's disease. Gut Pathogens, 1, 1: 1-5

Pierce E. S. 2009b. Where are all the *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in patients with Crohn's disease? PLoS Pathogens, 5, 3: e1000234

Pillars R. B., Grooms D. L., Kaneene J. B. 2009. Longitudinal study of the distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of dairy herds in the Michigan Johne's disease control demonstration herd project. Canadian Veterinary Journal, 50, 10: 1039-1046

Portaels F., Pattyn S. R. 1982. Growth of mycobacteria in relation to the pH of the medium. Annales de Microbiologie, 133, 2: 213-221

Pribylova R., Slana I., Kaevska M., Lamka J., Babak V., Jandak J., Pavlik I. 2011. Soil and plant contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* after exposure to naturally contaminated mouflon feces. Current Microbiology, 62, 5: 1405-1410

Prince D. S., Peterson D. D., Steiner R. M., Gottlieb J. E., Scott R., Israel H. L., Figueroa W. G., Fish J. E. 1989. Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. New England Journal of Medicine, 321, 13: 863-868

Pym A. S., Domenech P., Honore N., Song J. A., Deretic V., Cole S. T. 2001. Regulation of catalase-peroxidase (KatG) expression, isoniazid sensitivity and virulence by *furA* of *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular Microbiology, 40, 4: 879-889

Quadri L. E. N., Sello J., Keating T. A., Weinreb P. H., Walsh C. T. 1998. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. Chemistry & Biology, 5, 11: 631-645

Raizman E. A., Wells S. J., Godden S. M., Bey R. F., Oakes M. J., Bentley D. C., Olsen K. E. 2004. The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. Journal of Dairy Science, 87, 9: 2959-2966

Rao P. K., Rodriguez G. M., Smith I., Li Q. 2008. Protein dynamics in iron-starved *Mycobacterium tuberculosis* revealed by turnover and abundance measurement using hybrid-linear ion trap-Fourier transform mass spectrometry. Analytical Chemistry, 80, 18: 6860-6869

Rastogi N., Labrousse V. 1991. Extracellular and intracellular activities of clarithromycin used alone and in association with ethambutol and rifampin against *Mycobacterium avium* complex. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 35, 3: 462-470

Ratledge C., Ewing D. F. 1978. The separation of the mycobactins from *Mycobacterium smegmatis* by using high-pressure liquid chromatography. Biochemical Journal, 175, 3: 853-857

Ratledge C., Macham L. P., Brown K. A., Marshall B. J. 1974. Iron transport in *Mycobacterium smegmatis*: A restricted role for salicylic acid in the extracellular environment. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 372, 1: 39-51

Ratledge C., Winder F. G. 1962. The accumulation of salicylic acid by mycobacteria during growth on an iron-deficient medium. Biochemical Journal, 84, 501-506

Reddy V. M., Luna-Herrera J., Gangadharam P. R. J. 1996. Pathobiological significance of colony morphology in *Mycobacterium avium* complex. Microbial Pathogenesis, 21, 2: 97-109

Reed C., von Reyn C. F., Chamblee S., Ellerbrock T. V., Johnson J. W., Marsh B. J., Johnson L. S., Trenschel R. J., Horsburgh C. R. 2006. Environmental risk factors for infection with *Mycobacterium avium* complex. American Journal of Epidemiology, 164, 1: 32-40

Rengarajan J., Sassetti C. M., Naroditskaya V., Sloutsky A., Bloom B. R., Rubin E. J. 2004. The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. Molecular Microbiology, 53, 1: 275-282

Richardson E., More S. 2009. Direct and indirect effects of Johne's disease on farm and animal productivity in an Irish dairy herd. Irish Veterinary Journal, 62, 8: 526 - 532

Rodrigues L., Sampaio D., Couto I., Machado D., Kern W. V., Amaral L., Viveiros M. 2009. The role of efflux pumps in macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex. International Journal of Antimicrobial Agents, 34, 6: 529-533

Rodriguez G. M. 2006. Control of iron metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. Trends in Microbiology, 14, 7: 320-327

Rodriguez G. M., Smith I. 2006. Identification of an ABC transporter required for iron acquisition and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Bacteriology, 188, 2: 424-430

Rodriguez G. M., Voskuil M. I., Gold B., Schoolnik G. K., Smith I. 2002. *ideR*, an essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. Infection and Immunity, 70, 7: 3371-3381

Roiz M. P., Palenque E., Guerrero C., Garcia M. J. 1995. Use of restriction fragment length polymorphism as a genetic marker for typing *Mycobacterium avium* strains. Journal of Clinical Microbiology, 33, 5: 1389-1391

Rosenberg K., Bertaux J., Krome K., Hartmann A., Scheu S., Bonkowski M. 2009. Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. ISME Journal, 3, 6: 675-684

Rossi E. D., Aínsa J. A., Riccardi G. 2006. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. FEMS Microbiology Reviews, 30, 1: 36-52

Russell D. G., Dant J., Sturgill-Koszycki S. 1996. *Mycobacterium avium*- and *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. The Journal of Immunology, 156, 12: 4764-4773

Rutherford K., Parkhill J., Crook J., Horsnell T., Rice P., Rajandream M. A., Barrell B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. Bioinformatics, 16, 10: 944-945

Ryndak M. B., Wang S., Smith I., Rodriguez G. M. 2010. The *Mycobacterium tuberculosis* high-affinity iron importer, IrtA, contains an FAD-binding domain. Journal of Bacteriology, 192, 3: 861-869

Sala C., Forti F., Di Florio E., Canneva F., Milano A., Riccardi G., Ghisotti D. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* FurA autoregulates its own expression. Journal of Bacteriology, 185, 18: 5357-5362

Sala C., Haouz A., Saul F. A., Miras I., Rosenkrands I., Alzari P. M., Cole S. T. 2009. Genome-wide regulon and crystal structure of BlaI (Rv1846c) from *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular Microbiology, 71, 5: 1102-1116

Sambrook J., Russell D. W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd Edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2028 str.

Santhanagopalan S. M., Rodriguez G. M. 2012. Examining the role of Rv2895c (ViuB) in iron acquisition in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis, 92, 1: 60-62

Sartor R. B. 2006. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. Nature Clinical Practice. Gastroenterology and Hepatology, 3, 7: 390-407

Schaible U. E., Sturgill-Koszycki S., Schlesinger P. H., Russell D. G. 1998. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. The Journal of Immunology, 160, 3: 1290-1296

Schaller A., Sun Z., Yang Y., Somoskovi A., Zhang Y. 2002. Salicylate reduces susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to multiple antituberculosis drugs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46, 8: 2636-2639

Schmitt M. P., Predich M., Doukhan L., Smith I., Holmes R. K. 1995. Characterization of an iron-dependent regulatory protein (IdeR) of *Mycobacterium tuberculosis* as a functional homolog of the diphtheria toxin repressor (DtxR) from *Corynebacterium diphtheriae*. Infection and Immunity, 63, 11: 4284-4289

Schnappinger D., Ehrt S., Voskuil M. I., Liu Y., Mangan J. A., Monahan I. M., Dolganov G., Efron B., Butcher P. D., Nathan C., Schoolnik G. K. 2003. Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: Insights into the phagosomal environment. Journal of Experimental Medicine, 198, 5: 693-704

Schulze-Röbbecke R., Janning B., Fischeder R. 1992. Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. Tubercle and Lung Disease, 73, 3: 141-144

Semret M., Zhai G., Mostowy S., Cleto C., Alexander D., Cangelosi G., Cousins D., Collins D. M., van Soolingen D., Behr M. A. 2004. Extensive genomic polymorphism within *Mycobacterium avium*. Journal of Bacteriology, 186, 18: 6332-6334

Sevilla I., Garrido J., Geijo M., Juste R. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. BMC Microbiology, 7, 1: 18, doi:10.1186/1471-2180-1187-1118

Shin S. J., Collins M. T. 2008. Thiopurine drugs azathioprine and 6-mercaptopurine inhibit *Mycobacterium paratuberculosis* growth in vitro. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52, 2: 418-426

Shitaye E. J., Grymova V., Grym M., Halouzka R., Horvathova A., al. e. 2009. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection in a pet parrot. Emerging Infectious Diseases, 15, 4: 617-619

Siegrist M. S., Unnikrishnan M., McConnell M. J., Borowsky M., Cheng T.-Y., Siddiqi N., Fortune S. M., Moody D. B., Rubin E. J. 2009. Mycobacterial Esx-3 is required for mycobactin-mediated iron acquisition. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106, 44: 18792-18797

Sison J. P., Yao Y., Kemper C. A., Hamilton J. R., Brummer E., Stevens D. A., Deresinski S. C. 1996. Treatment of *Mycobacterium avium* complex infection: Do the results of *in vitro* susceptibility tests predict therapeutic outcome in humans? Journal of Infectious Diseases, 173, 3: 677-683

Skriwan C., Fajardo M., Hagele S., Horn M., Wagner M., Michel R., Krohne G., Schleicher M., Hacker J., Steinert M. 2002. Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. International Journal of Medical Microbiology, 291, 615 - 624

Slana I., Kaevska M., Kralik P., Horvathova A., Pavlik I. 2010. Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *M. a. hominissuis* in artificially infected pigs studied by culture and IS*901* and IS*1245* quantitative real time PCR. Veterinary Microbiology, 144, 3–4: 437-443

Slana I., Pribylova R., Kralova A., Pavlik I. 2011. Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at a farm-scale biogas plant supplied with manure from paratuberculosis-affected dairy cattle. Applied and Environmental Microbiology, 77, 9: 3115-3119

Smeed J., Watkins C., Rhind S., Hopkins J. 2007. Differential cytokine gene expression profiles in the three pathological forms of sheep paratuberculosis. BMC Veterinary Research, 3, 1: 18, doi:10.1186/1746-6148-1183-1118

Smith D., Haensch H., Bancroft G., Ehlers S. 1997. T-cell-independent granuloma formation in response to *Mycobacterium avium*: role of tumour necrosis factor-α and interferon-γ. Immunology, 92, 4: 413-421

Smith J. L. 2004. The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. Critical Reviews in Microbiology, 30, 3: 173-185

Smith R. L., Schukken Y. H., Pradhan A. K., Smith J. M., Whitlock R. H., Van Kessel J. S., Wolfgang D. R., Grohn Y. T. 2011. Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in endemically infected dairy herds. Preventive Veterinary Medicine, 102, 1: 1-9

Snow G. A. 1970. Mycobactins: Iron-chelating growth factors from mycobacteria. Bacteriological Reviews, 34, 2: 99-125

Snydman D. R., Redelman-Sidi G., Sepkowitz K. A. 2010. Rapidly growing mycobacteria infection in patients with cancer. Clinical Infectious Diseases, 51, 4: 422-434

Spahr U., Schafroth K. 2001. Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk. Applied and Environmental Microbiology, 67, 9: 4199-4205

Sritharan M., Yeruva V. C., Sivasailappan S. C., Duggirala S. 2006. Iron enhances the susceptibility of pathogenic mycobacteria to isoniazid, an antitubercular drug. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 22, 12: 1357-1364

St-Jean G., Jernigan A. D. 1991. Treatment of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in ruminants. Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice, 7, 3: 793-804

Stabel J. R. 2000. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. Veterinary Microbiology, 77, 3–4: 465-473

Steed K. A., Falkinham J. O. 2006. Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. Applied and Environmental Microbiology, 72, 6: 4007-4011

Stepanova H., Pavlova B., Stromerova N., Ondrackova P., Stejskal K., Slana I., Zdrahal Z., Pavlik I., Faldyna M. 2012. Different immune response of pigs to *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection. Veterinary Microbiology, 159, 3–4: 343-350

Stephan R., Schumacher S., Tasara T., Grant I. R. 2007. Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level. Journal of Dairy Science, 90, 8: 3590-3595

Stevenson K., Alvarez J., Bakker D., Biet F., de Juan L., Denham S., Dimareli Z., Dohmann K., Gerlach G., Heron I., Kopecna M., May L., Pavlik I., Sharp J. M., Thibault V., Willemsen P., Zadoks R., Greig A. 2009. Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. BMC Microbiology, 9, 1: 212, doi:210.1186/1471-2180-1189-1212

Talaat A. M., Lyons R., Howard S. T., Johnston S. A. 2004. The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. PNAS, 101, 13: 4602-4607

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24, 8: 1596-1599

Taylor R. H., Falkinham J. O., Norton C. D., LeChevallier M. W. 2000. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. Applied and Environmental Microbiology, 66, 4: 1702-1705

Taylor S. J., Ahonen L. J., de Leij F. A. A. M., Dale J. W. 2003. Infection of *Acanthamoeba castellanii* with *Mycobacterium bovis* and *M. bovis* BCG and survival of *M. bovis* within the amoebae. Applied and Environmental Microbiology, 69, 7: 4316-4319

Thegerström J., Jönsson B., Brudin L., Olsen B., Wold A. E., Ernerudh J., Friman V. 2012. *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and subsp. *hominissuis* give different cytokine

responses after *in vitro* stimulation of human blood mononuclear cells. PLoS ONE, 7, 4: e34391

Thomas V., McDonnell G. 2007. Relationship between mycobacteria and amoebae: ecological and epidemiological concerns. Letters in Applied Microbiology, 45, 4: 349-357

Thomas V., McDonnell G., Denyer S., Maillard J. 2010. Free-living amoeba and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. FEMS Microbiology Reviews, 34, 3: 231-259

Thorel M.-F., Krichevsky M., Vincent Lévy-Frébault V. 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 40, 3: 254-260

Thorel M. F., Huchzermeyer H. F., Michel A. L. 2001. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. Revue scientifique et technique, 20, 1: 204-218

Tobin-D'Angelo M. J., Blass M. A., del Rio C., Halvosa J. S., Blumberg H. M., Horsburgh C. R. 2004. Hospital water as a source of *Mycobacterium avium* complex isolates in respiratory specimens. Journal of Infectious Diseases, 189, 1: 98-104

Tullius M. V., Harmston C. A., Owens C. P., Chim N., Morse R. P., McMath L. M., Iniguez A., Kimmey J. M., Sawaya M. R., Whitelegge J. P., Horwitz M. A., Goulding C. W. 2011. Discovery and characterization of a unique mycobacterial heme acquisition system. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108, 12: 5051-5056

Turenne C. Y., Collins D. M., Alexander D. C., Behr M. A. 2008. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. Journal of Bacteriology, 190, 7: 2479-2487

Turenne C. Y., Wallace R., Behr M. A. 2007. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. Clinical Microbiology Reviews, 20, 2: 205-229

Vaerewijck M. J. M., Huys G., Palomino J. C., Swings J., Portaels F. 2005. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. FEMS Microbiology Reviews, 29, 5: 911-934

Van Brandt L., Coudijzer K., Herman L., Michiels C., Hendrickx M., Vlaemynck G. 2011. Survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in yoghurt and in commercial fermented milk products containing probiotic cultures. Journal of Applied Microbiology, 110, 5: 1252-1261

Van Schaik G., Stehman S. M., Schukken Y. H., Rossiter C. R., Shin S. J. 2003. Pooled fecal culture sampling for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at different herd sizes and prevalence. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 15, 3: 233-241

Vansnick E., de Rijk P., Vercammen F., Geysen D., Rigouts L., Portaels F. 2004. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Veterinary Microbiology, 100, 3–4: 197-204

Verna A. E., Garcia-Pariente C., Muñoz M., Moreno O., García-Marin J. F., Romano M. I., Paolicchi F., Pérez V. 2007. Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Zoonoses and Public Health, 54, 6-7: 243-252

Vincent Lévy-Frébault V., Portaels F. 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. International Journal of Systematic Bacteriology, 42, 2: 315-323

Viollier E., Inglett P. W., Hunter K., N.Roychoudhury A., Cappellen P. V. 2000. The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. Applied Geochemistry, 15: 785-790

Viveiros M., Leandro C., Amaral L. 2003. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. International Journal of Antimicrobial Agents, 22, 3: 274-278

Von Reyn C. F., Marlow J. N., Arbeit R. D., Barber T. W., Falkinham J. O. 1994. Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. The Lancet, 343, 8906: 1137-1141

Wagner D., Maser J., Lai B., Cai Z. H., Barry C. E., Bentrup K. H. Z., Russell D. G., Bermudez L. E. 2005. Elemental analysis of *Mycobacterium avium*-, *Mycobacterium tuberculosis*-, and *Mycobacterium smegmatis*-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. Journal of Immunology, 174, 3: 1491-1500

Wall S., Kunze Z. M., Saboor S., Soufleri I., Seechurn P., Chiodini R., McFadden J. J. 1993. Identification of spheroplast-like agents isolated from tissues of patients with Crohn's disease and control tissues by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, 31, 5: 1241-1245

Wallace J. M., Hannah J. B. 1988. *Mycobacterium avium* complex infection in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. A clinicopathologic study. CHEST Journal, 93, 5: 926-932

Wayne L. G., Hayes L. G. 1996. An in vitro model for sequential study of shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. Infection and Immunity, 64, 6: 2062-2069

Weekers P. H. H., Bodelier P. L. E., Wijen J. P. H., Vogels G. D. 1993. Effects of grazing by the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 59, 7: 2317-2319

Weigoldt M., Meens J., Doll K., Fritsch I., Möbius P., Goethe R., Gerlach G. F. 2011. Differential proteome analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* grown in vitro and isolated from cases of clinical Johne's disease. Microbiology, 157, 2: 557-565

Weiss D. J., Evanson O. A., Moritz A., Deng M. Q., Abrahamsen M. S. 2002. Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. Infection and Immunity, 70, 10: 5556-5561

Weiss D. J., Souza C. D. 2008. Modulation of mononuclear phagocyte function by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Veterinary Pathology Online, 45, 6: 829-841

Wendt S. L., George K. L., Parker B. C., Gruft H., Falkinham J. O. 1980. Epidemiology of infection by nontuberculous Mycobacteria. III. Isolation of potentially pathogenic mycobacteria from aerosols. The American review of respiratory disease, 122, 2: 259-263

Whan L., Grant I., Rowe M. 2006. Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and environmental protozoa. BMC Microbiology, 6, 63, doi:10.1186/1471-2180-1186-1163

Whittington R. J., Hope A. F., Marshall D. J., Taragel C. A., Marsh I. 2000. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS*900* restriction fragment length polymorphism and IS*1311* polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. Journal of Clinical Microbiology, 38, 9: 3240-3248

Whittington R. J., Marsh I. B., Reddacliff L. A. 2005. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. Applied and Environmental Microbiology, 71, 9: 5304-5308

Whittington R. J., Marshall D. J., Nicholls P. J., Marsh I. B., Reddacliff L. A. 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. Applied and Environmental Microbiology, 70, 5: 2989-3004

Whittington R. J., Sergeant E. S. G. 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in animal populations. Australian Veterinary Journal, 79, 4: 267-278

Windsor P. A., Whittington R. J. 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. The Veterinary Journal, 184, 1: 37-44

Wisedchaisri G., Holmes R. K., Hol W. G. J. 2004. Crystal structure of an IdeR–DNA complex reveals a conformational change in activated IdeR for base-specific interactions. Journal of Molecular Biology, 342, 4: 1155-1169

Wong D. K., Gobin J., Horwitz M. A., Gibson B. W. 1996. Characterization of exochelins of *Mycobacterium avium*: evidence for saturated and unsaturated and for acid and ester forms. Journal of Bacteriology, 178, 21: 6394-6398

Wu C. W., Glasner J., Collins M., Naser S., Talaat A. M. 2006. Whole-genome plasticity among *Mycobacterium avium* subspecies: Insights from comparative genomic hybridizations. Journal of Bacteriology, 188, 2: 711-723

Wu C. W., Schmoller S. K., Shin S. J., Talaat A. M. 2007. Defining the stressome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in vitro and in naturally infected cows. Journal of Bacteriology, 189, 21: 7877-7886

Wyllie S., Seu P., Goss J. A. 2002. The natural resistance-associated macrophage protein 1 Slc11a1 (formerly Nramp1) and iron metabolism in macrophages. Microbes and Infection, 4, 3: 351-359

Yajko D. M., Sanders C. A., Madej J. J., Cawthon V. L., Hadley W. K. 1996. In vitro activities of rifabutin, azithromycin, ciprofloxacin, clarithromycin, clofazimine, ethambutol, and amikacin in combinations of two, three, and four drugs against *Mycobacterium avium*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 40, 3: 743-749

Yellaboina S., Ranjan S., Vindal V., Ranjan A. 2006. Comparative analysis of iron regulated genes in mycobacteria. FEBS Letters, 580, 11: 2567-2576

Yeruva V. C., Duggirala S., Lakshmi V., Kolarich D., Altmann F., Sritharan M. 2006. Identification and characterization of a major cell wall-associated iron-regulated envelope protein (Irep-28) in *Mycobacterium tuberculosis*. Clinical and Vaccine Immunology, 13, 10: 1137-1142

Zámocký M., Regelsberger G., Jakopitsch C., Obinger C. 2001. The molecular peculiarities of catalase-peroxidases. FEBS Letters, 492, 3: 177-182

Zanetti S., Molicotti P., Cannas S., Ortu S., Ahmed N., Sechi L. 2006. "In vitro" activities of antimycobacterial agents against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* linked to Crohn's disease and paratuberculosis. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 5, 1: 27, doi:10.1186/1476-0711-1185-1127

Zhang M. Z., Zhang S. 2011. An efficient DNA extraction method for polymerase chain reaction–based detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bovine fecal samples. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 23, 1: 41-48

Zhang Y., Heym B., Allen B., Young D., Cole S. 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature, 358, 6387: 591-593

Zhu W., Arceneaux J. E. L., Beggs M. L., Byers B. R., Eisenach K. D., Lundrigan M. D. 1998. Exochelin genes in *Mycobacterium smegmatis*: identification of an ABC transporter and two non-ribosomal peptide synthetase genes. Molecular Microbiology, 29, 2: 629-639

Zhu X., Tu Z. J., Coussens P. M., Kapur V., Janagama H., Naser S., Sreevatsan S. 2008. Transcriptional analysis of diverse strains *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in primary bovine monocyte derived macrophages. Microbes and Infection, 10, 12–13: 1274-1282

Zwahlen J., Kolappan S., Zhou R., Kisker C., Tonge P. J. 2007. Structure and mechanism of MbtI, the salicylate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. Biochemistry, 46, 4: 954-964

Zwick L. S., Walsh T. F., Barbiers R., Collins M. T., Kinsel M. J., Murnane R. D. 2002. Paratuberculosis in a Mandrill (*Papio Sphinx*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 14, 4: 326-328

ZAHVALA

Svojemu mentorju, dr. Alešu Lapanje, bi se zahvali za izvrstno strokovno podporo, za plodne diskusije in izvirne ideje, ki so mi pomagale pri identifikaciji in reševanju problemov ter me spodbudile k razmišljanju izven okvirjev.

Zahvalil bi se vsem sodelavcem na Inštitutu za fizikalno biologijo d.o.o., ki so mi priskočili na pomoč, kadar sem jo potreboval, in ki so mi s humorjem in kolegialnostjo ustvarili sproščeno delovno okolje.

Zahvalil bi se dr. Matjažu Ocepku z Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, da me je vpeljal v svet paratuberkuloze, mi omogočil izvedbo vzorčenja in priskrbel različne seve za izvedbo eksperimentov.

Hvala dr. Manci Žolnir Dovč iz Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergije Golnik, ki mi je pomagala z nasveti glede rabe antibiotikov pri mikobakterijskih infekcijah.

Zahvalil bi se Diani Grublješič, ki mi je v okviru svoje diplomske naloge priskočila na pomoč v boju s poplavo kvantifikacijskih eksperimentov.

Zahvala gre tudi Dr. Jamesu Wynneu in dr. Wojteku Michalskemu iz CSIRO, Avstralija, ki sta mi omogočila dostop do genomskih podatkov različnih sevov MAP, še preden so bila objavljena v javnih bazah nukleotidnih zaporedij, hkrati pa sta mi priskrbela seve za izvedbo dela eksperimentov.

Hvala dr. Williamu Bishaiu iz Centra za tuberkulozne raziskave John Hopkins, Baltimore, ZDA, ki mi je prijazno podaril sev MAH 104.

Hvala dr. Mihi Skvarču iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, za podarjene kulture ameb.

Velika zahvala gre moji ženi Špeli, ki mi je v stresnih obdobjih nudila podporo in me venomer spodbujala. Skupaj z Jašo sta mi pričarala nasmeh na obrazu tudi v najbolj napornih trenutkih in mi vlila novih moči.

Hvaležen sem svoji mami, sestri in vsej ostali družini, ki me je podpirala, verjela vame in mi omogočila, da sem postal, kar sem in kar še bom.

Priloga A:

Poravnava pomnoženih odsekov IS*900* in IS*1245* z zaporedjem IS*900* in IS*1245* iz baze nukleotidnih zaporedij

Pike v poravnavi prikazujejo enakost, vodoravne črte pa manjkajoče baze v primerjavi z zaporedjem iz baze Genebank (prva vrsta). *A* – poravnava IS*900* pomnožkov z zaporedjem IS*900* (Genebank ID: AF416985); *B* – poravnava IS*1245* pomnožkov z zaporedjem IS*1245* (Genebank ID: L33879); začetnih cca 45 nukleotidov pri PCR pomnožkih IS*1245* manjka zaradi naleganja začetnega nukleotida za sekveniranje.

A

```
                                        10        20        30        40        50        60
IS900 putative transposase, AF416985    GCGTCGGGAGTTTGGTAGCCAGTAAGCAGGATCAGCGCGGCACGGCTCTTGTTGTAGTCGAAGGC
100701-15 A13 A1-M13F.ab1 1 950         ............................................................
100701-15 A15 C3-M13F.ab1 1 950         ............................................................
100701-15 A17 F2-M13F.ab1 1 950         ............................................................
100701-15 A19 I3-M13F.ab1 1 950         ............................................................
100701-15 C13 A2-M13F.ab1 1 950         ...........................................................T........
100701-15 E13 A3-M13F.ab1 1 950         ............................................................
100701-15 E15 D2-M13F.ab1 1 950         ...........................................................T........
100701-15 G15 D3-M13F.ab1 1 950         ............................................................
100701-15 G17 H1-M13F.ab1 1 950         ............................................................
100701-15 I13 B2-M13F.ab1 1 950         ......................C.....................................................
100701-15 I15 E1-M13F.ab1 1 950         ............................................................
100701-15 I17 H2-M13F.ab1 1 950         ............................................................
100701-15 K15 E2-M13F.ab1 1 950         ............................................................
100701-15 K17 H3-M13F.ab1 1 949         ............................................................
100701-15 M13 C1-M13F.ab1 1 949         ............................................................
100701-15 M15 E3-M13F.ab1 1 950         ............................................................
100701-15 M17 I1-M13F.ab1 1 950         ............................................................
100701-15 O13 C2-M13F.ab1 1 950         ............................................................
100701-15 O15 F1-M13F.ab1 1 950         ............................................................
100701-15_O17_I2-M13F.ab1 1 950         ............................................................
```

B

```
                                        10        20        30        40        50        60        70
IS1245 transposase gene, L33879         CCGGATCTGCAAAGACCTCGACACCGAGGTCGCGGCCTTCCGGGACCGGCCGTTGGGTGATCAGCGCTTTC
14P IS1245 F                            ----------------------------------------------------.....................
NP16 IS1245 F                           ------------------------------------------------------------.............
Z6 IS1245 F                             ----------------------------------------------------.....................
Z15_IS1245_F                            ----------------------------------------------------.....................

                                            70        80        90        100       110       120       130
IS1245 transposase gene, L33879         CAGCGCTTTCCGTATGTCTTCCTCGACGCCACCTACTGCAAGGCCCGGGTGAATCATCGGGTGGTGTCG
14P IS1245 F                            ..........................................................................
NP16 IS1245 F                           ..........................................................................
Z6 IS1245 F                             ...........................................................A..............
Z15_IS1245_F                            ..........................................................................
```

Priloga B:

Razdelitev okoljskih vzorcev po razredih glede na izvor

Razredi glede na vrsto vzorca	*Oznake vzorčnih mest*[a]	*Št. vseh vzorcev N (%)*
Kmetija A		
Vzorci, ki so vsebovali feces	3, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 18, 27, 30, 31	26 (44,8)
Vzorci napajalnikov	1, 2, 21, 22, 23, 24	14 (24,1)
Vzorci stoječih in tekočih površinskih voda	12, 15, 19, 20, 25, 26, 28, 29, 33	14 (24,1)
Drugi okoljski vzorci	4, 9, 17, 32	4 (6,9)
Skupaj		**58 (100,0)**
Kmetija B		
Vzorci, kontaminirani s fecesom	1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 13, 18, 25, 26	16 (38,1)
Vzorci napajalnikov	10, 10A, 11	5 (11,9)
Vzorci stoječih in tekočih površinskih voda	4, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 29	14 (33,3)
Drugi okoljski vzorci	6, 12, 16, 27, 28, 30	7 (16,7)
Skupaj		**42 (100,0)**

[a] za opis vzorčnih mest glej Prilogo C

Priloga C:

Popis vzorčnih mest, število kopij IS*900* in prisotnost IS*1245* v vzorcih s kmetij

Priloga C1: Popis vzorcev, število kopij IS*900* in prisotnost IS*1245* v vzorcih s kmetije A.

				Datum vzorčenja					
				Maj 2010		*Jul 2010*		*Nov 2011*	
Oznaka vzorca	*Tip vzorca*	*Opis/orientacija*	*Enota vzorca*	*MAP [št. bakterij/enoto vzorca][a]*	*IS1245 [+/-]*	*MAP [št. bakterij/enoto vzorca]*	*IS1245 [+/-]*	*MAP [št. bakterij/enoto vzorca]*	*IS1245 [+/-]*
1	voda	Napajalnik na levi strani hleva/Z	ml	$4{,}1 \pm 3{,}2 \cdot 10^{1}$	−	[b]$3{,}4 \pm 2{,}5 \cdot 10^{3}$	−	[c]pmd	−
2	voda	Napajalnik na desni strani hleva/Z	ml	$6{,}6 \pm 0{,}6$	−	[d]$7{,}0 \pm 4{,}0 \cdot 10^{3}$	−	$3{,}9 \pm 0{,}6 \cdot 10^{1}$	−
3	gnojevka	Iz tal v staji	g	$1{,}1 \pm 0{,}7 \cdot 10^{5}$	−	$8{,}6 \pm 0{,}1 \cdot 10^{5}$	−	$9{,}7 \pm 2{,}2 \cdot 10^{4}$	+
4	biofilm	Biofilm ob robu ventilatorja za prezračevanje	g	[e]nk	+	[f]/	/	/	/
5	gnojnica	Zbiralni odvodni vod v hlevu	ml	$1{,}4 \pm 0{,}04 \cdot 10^{7}$	−	$4{,}8 \pm 1{,}2 \cdot 10^{6}$	−	$5{,}5 \pm 0{,}5 \cdot 10^{6}$	−
7	voda	Stoječa voda pred hlevom, na V strani hleva	ml	$2{,}0 \pm 0{,}9 \cdot 10^{5}$	+	/	/	/	/
8	blato	Pot goveda na pašnik na V strani hleva	g	$7{,}9 \pm 2{,}7 \cdot 10^{4}$	+	$3{,}1 \pm 1{,}9 \cdot 10^{5}$	+	$2{,}6 \pm 0{,}5 \cdot 10^{6}$	+
9	silaža	Balirano seno, pod streho	g	pmd	−	/	/	/	/
10	voda	Stoječa voda poleg poti goveda na pašnik na V strani hleva	ml	$2{,}2 \pm 0{,}2 \cdot 10^{6}$	+	/	/	/	/
11	gnojnica	Gnojišče na J strani hleva	ml	$6{,}6 \pm 0{,}8 \cdot 10^{5}$	+	nk	+	$6{,}0 \pm 1{,}9 \cdot 10^{5}$	+
12	voda	Prečiščena voda v dveh zbiralnikih, poleg črpalnega stolpa gnojnice iz hleva	ml	$2{,}5 \pm 1{,}6 \cdot 10^{3}$	−	$9{,}2 \pm 4{,}3 \cdot 10^{3}$	−	$2{,}6 \pm 0{,}4 \cdot 10^{4}$	−
13	blato	Pot goveda na pašnik na J strani hleva	g	$2{,}3 \pm 1{,}3 \cdot 10^{5}$	+	$1{,}8 \pm 0{,}3 \cdot 10^{6}$	−	$2{,}7 \pm 1{,}3 \cdot 10^{7}$	+
14	gnojnica	Iz druge strani gnojišča na J strani hleva	ml	$2{,}7 \pm 0{,}3 \cdot 10^{5}$	+	/	/	/	/
15	voda	Kanal z vodo, ki vodi od pokrite kompresirane silaže, JZ od hleva	ml	$2{,}8 \pm 0{,}3 \cdot 10^{2}$	−	/	/	/	/
16	voda	Stoječa voda v cevi cisterne za prevoz gnojnice/J	ml	$1{,}5 \pm 0{,}1 \cdot 10^{6}$	+	nk	+	$2{,}5 \pm 0{,}3 \cdot 10^{7}$	+
17	silaža	Pokrita silaža, fermentirana, zunanje skladišče, pokrito s polivinilom	g	/	/	pmd	−	/	/

Priloga C1: Nadaljevanje...

Oznaka vzorca	*Tip vzorca*	*Opis/orientacija*	*Enota vzorca*	*Datum vzorčenja*					
				Maj 2010		*Jul 2010*		*Nov 2011*	
				MAP [št. bakterij/enoto vzorca][a]	*IS1245 [+/-]*	*MAP [št. bakterij/enoto vzorca]*	*IS1245 [+/-]*	*MAP [št. bakterij/enoto vzorca]*	*IS1245 [+/-]*
18	gnojevka	Staro gnojišče	ml	/	/	$1{,}8 \pm 0{,}5 \cdot 10^5$	+	$3{,}4 \pm 0{,}6 \cdot 10^4$	+
19	voda	Stoječa voda pred vhodom v hlev/Z	ml	/	/	$3{,}5 \pm 0{,}5 \cdot 10^3$	−	$4{,}1 \pm 1{,}2 \cdot 10^4$	+
20	voda	Stoječa voda pred velikim rezervoarjem vode za hlevom/S, pri pokriti balirani silaži	ml	/	/	/	/	pmd	−
21	biofilm	Izsušen napajalnik pred stajo s teleti, kovinski	g	/	/	$4{,}6 \pm 2{,}8 \cdot 10^4$	−	pmd	
22	voda	Napajalnik poleg 21	ml	/	/	$2{,}4 \pm 0{,}06 \cdot 10^2$	−	$1{,}1 \pm 0{,}4 \cdot 10^1$	−
23	voda	Napajalnik, betonski, druga stran hleva kot 1 in 2	ml	/	/	$9{,}3 \pm 0{,}2 \cdot 10^3$	−	$2{,}2 \pm 0{,}2 \cdot 10^2$	+
24	voda	Samodozirni mali napajalnik v staji	ml	/	/	pmd	−	pmd	−
25	voda	Stoječa voda v trsju sredi pašnika	ml	/	/	$4{,}1 \pm 3{,}9 \cdot 10^1$	−	pmd	−
26	voda	Potok v gozdičku na robu pašnika/SV	ml	/	/	pmd	−	$2{,}2 \pm 0{,}04 \cdot 10^2$	+
27	iztrebek	Kravjak na pašniku/SV	g	/	/	pmd	−	/	/
28	voda	Potok pod cesto/JZ	ml	/	/	pmd	−	/	/
29	sediment	Brežina potoka 28	g	/	/	pmd	−	/	/
30	sediment	Shojeno blato okoli krmilnika na pašniku/SV- vzorec 1	g	/	/	/	/	$2{,}6 \pm 0{,}2 \cdot 10^5$	+
31	sediment	Shojeno blato okoli krmilnika na pašniku/SV- vzorec 2	g	/	/	/	/	$1{,}8 \pm 0{,}2 \cdot 10^6$	+
32	silaža	Razprostrta silaža po tleh hleva	g	$4{,}0 \pm 3{,}4 \cdot 10^2$	−	/	/	/	/
33	voda	Deževnica, pomešana s silažo, v zunanjem napajalniku pri biku/J	ml	/	/	/	/	$1{,}9 \pm 0{,}04 \cdot 10^7$	+
		Skupaj analiziranih vzorcev		16	16	21	21	21	21
		Pozitivni vzorci N(%)		15(94)	8(50)	15(71)	4(19)	16(76)	12(57)

[a] št. bakterij smo izračunali ob predpostavki, da en genom MAP v povprečju vsebuje 15 kopij IS*900* (Bull in sod. 2000); [b, d] vzorca 1 in 2, odvzeta julija, sta vsebovala poleg vode tudi postrgan biofilm iz sten napajalnika; [c] pmd – pod mejo detekcije; [e] nk – vzorec je bil pozitiven, vendar kvantifikacija ni bila možna zaradi močne inhibicije PCR, ki je nismo mogli rešiti z redčitvijo vzorca; [f] / - ni bilo vzorčeno

Priloga C2: Kvantifikacija MAP (IS*900*) v fekalnih vzorcih izbranih krav s sumom na paratuberkulozo na kmetiji A

Oznaka vzorca	*Opis*	*Koncentracija MAP [št. bakterij/enoto vzorca][a]*	
		Enota vzorca	*Jul 2010*
1A	Krava s simptomi Johne-jeve bolezni 1	g	$3{,}9 \pm 0{,}3 \cdot 10^{6}$
2A	Krava s simptomi Johne-jeve bolezni 2	g	$2{,}2 \pm 0{,}06 \cdot 10^{8}$
3A	Krava s simptomi Johne-jeve bolezni 3	g	$1{,}7 \pm 0{,}1 \cdot 10^{7}$
4A	Krava s simptomi Johne-jeve bolezni 4	g	$1{,}7 \pm 0{,}8 \cdot 10^{6}$
5A	Krava s simptomi Johne-jeve bolezni 5	g	$1{,}5 \pm 0{,}6 \cdot 10^{4}$
6A	Krava s simptomi Johne-jeve bolezni 6	g	$1{,}4 \pm 0{,}3 \cdot 10^{3}$
7A	Krava s simptomi Johne-jeve bolezni 7	g	$6{,}9 \pm 5{,}0 \cdot 10^{4}$
8A	Krava s simptomi Johne-jeve bolezni 8	g	$4{,}0 \pm 0{,}2 \cdot 10^{8}$
9A	Krava s simptomi Johne-jeve bolezni 9	g	$1{,}2 \pm 0{,}4 \cdot 10^{4}$
10A	Krava s simptomi Johne-jeve bolezni 10	g	$3{,}2 \pm 0{,}4 \cdot 10^{4}$

[a] št. bakterij smo izračunali ob predpostavki, da en genom MAP v povprečju vsebuje 15 kopij IS900 (Bull in sod. 2000)

Priloga C3: Popis vzorcev, število kopij IS*900* in prisotnost IS*1245* v vzorcih s kmetije B.

				Datum vzorčenja			
				Maj 2010		*Jul 2011*	
Oznaka vzorca	*Tip vzorca*	*Opis/orientacija*	*Enota vzorca*	*MAP [št. bakterij/enoto vzorca][a]*	*IS1245 [+/-]*	*MAP [št. bakterij/enoto vzorca]*	*IS1245 [+/-]*
1	feces	Krava s simptomi Johne-jeve bolezni/hlev 1	g	$1{,}0 \pm 0{,}07 \cdot 10^{9}$	−	[b]/	/
2	gnojnica	Stranski odvodni kanal/hlev 1	ml	$1{,}8 \pm 0{,}0 \cdot 10^{5}$	−	/	/
3	feces	Skupni odvodni kanal/JZ hlev 1	g	$1{,}6 \pm 0{,}6 \cdot 10^{4}$	−	$4{,}0 \pm 0{,}3 \cdot 10^{2}$	−
4	voda	Stoječa voda pred stajo/JZ hlev 1	ml	$8{,}0 \pm 2{,}8 \cdot 10^{5}$	+	/	/
5	gnojnica	Stoječa gnojnica v fecesu na tleh v staji/JZ hlev 1	ml	$3{,}1 \pm 0{,}4 \cdot 10^{5}$	+	/	/
6	sediment	Na tleh, kjer je bila nekoč staja (vzorčno mesto 5)/JZ hlev 1	g	/	/	$6{,}3 \pm 0{,}2 \cdot 10^{2}$	+
7	gnojnica	Novo gnojišče	ml	$3{,}1 \pm 0{,}5 \cdot 10^{3}$	+	[c]pmd	+
8	sediment	Staro gnojišče	g	$1{,}0 \pm 0{,}6 \cdot 10^{5}$	−	pmd	−
9	gnojnica	Odvodni kanal v staji/hlev 2	ml	$6{,}9 \pm 0{,}8 \cdot 10^{5}$	−	/	/
10	voda	Voda z usedlino iz napajalnika levo/hlev 2 JZ	ml	$1{,}5 \pm 0{,}1 \cdot 10^{1}$	−	$4{,}3 \pm 1{,}8$	+
10A	biofilm	Biofilm iz sten napajalnika iz vzorčnega mesta 10	ml	$4{,}6 \pm 0{,}4 \cdot 10^{5}$	−	/	/
11	voda	Voda z usedlino iz napajalnika desno/hlev 2 JZ	ml	$2{,}2 \pm 0{,}7 \cdot 10^{6}$	−	$0{,}16 \pm 0{,}01$	−
12	silaža	Razprostrta silaža po tleh hleva 2	g	pmd	−	/	/
13	gnojnica	Iztok iz hleva 2/JZ	ml	$1{,}1 \pm 0{,}1 \cdot 10^{5}$	−	$3{,}9 \pm 0{,}2 \cdot 10^{3}$	+
14	voda	Stoječa voda pred hlevom 2/JZ vhod	ml	pmd	−	$1{,}9 \pm 1{,}0 \cdot 10^{1}$	−
15	voda	Stoječa voda pred pokritim skladiščem kompresirane silaže -desno/SV	ml	$2{,}2 \pm 2{,}6 \cdot 10^{2}$	+	pmd	+
16	silaža	Kompresirana silaža/SV	ml	pmd	−	$6{,}3 \pm 1{,}9 \cdot 10^{2}$	+
17	voda	Stoječa voda pred pokritim skladiščem kompresirane silaže-levo/SV	ml	pmd	+	/	/
18	gnojnica	Bazen odvajane gnojnice iz hleva 2/SV	g	$1{,}2 \pm 0{,}1 \cdot 10^{7}$	+	$2{,}1 \pm 0{,}3 \cdot 10^{3}$	+
19	voda	Skupni odvodni kanal odpadne vode iz kmetije/jašek Z	ml	$4{,}7 \pm 0{,}3 \cdot 10^{5}$	+	$1{,}6 \pm 0{,}2$	+

Priloga C3: Nadaljevanje...

Oznaka vzorca	*Tip vzorca*	*Opis/orientacija*	*Enota vzorca*	*Datum vzorčenja*			
				Maj 2010		*Jul 2011*	
				MAP [št. bakterij/enoto vzorca][a]	*IS1245 [+/-]*	*MAP [št. bakterij/enoto vzorca]*	*IS1245 [+/-]*
20	biofilm	Biofilm v levi in desni cevi, ki se stekata v skupni odvodni kanal (19) v jašku/Z	g	$1{,}6 \pm 0{,}5 \cdot 10^6$	+	/	/
21	voda	Stoječa voda poleg jaška (19)/Z	ml	pmd	−	/	/
22	voda	Direktno za iztokom odpadne vode v potok/Z	ml	$6{,}2 \pm 1{,}4 \cdot 10^4$	+	/	/
23	biofilm	2 cm debel biofilm na lesenem vodilu, preko katerega teče odpadna voda v potok/Z	g	$2{,}5 \pm 1{,}7 \cdot 10^5$	+	/	/
24	sediment	Breg potoka 50 m nižje od iztoka odpadne vode/JZ	g	pmd	−	/	/
25	sediment	Izhod na pašnike/SV	g	/	/	$7{,}9 \pm 0{,}7 \cdot 10^3$	+
26	feces	Feces pomešan s steljo v staji s telicami/SZ	g	/	/	pmd	+
27	sediment	Pašnik, severno od staji s telicami/SZ	g	/	/	pmd	−
28	rastlinje	Zgornji deli rastlin (20 cm od tal) s pašnika (27)	g	/	/	pmd	−
29	voda	Potok, 200 m od iztoka odpadne vode iz kmetije/JZ	ml	/	/	5,3 ± 1,6	+
30	sediment	Pašnik, zahodno od hleva 1	g	/	/	pmd	−
		Skupaj analiziranih vzorcev		24	24	18	18
		Pozitivni vzorci N(%)		18(75)	10(42)	11(61)	11(61)

[a] št. bakterij smo izračunali ob predpostavki, da en genom MAP v povprečju vsebuje 15 kopij IS*900* (Bull in sod. 2000)
[b] / - ni bilo vzorčeno
[c] pmd - pod mejo detekcije

Priloga D:

Mikroskopiranje vzorcev iz kmetije A in B ter izoliranih ameb iz okoljskih vzorcev

Priloga D1: Kvalitativna mikroskopska karakterizacija vzorcev iz kmetij A in B za vzorčenje maja 2010. Prazna polja pomenijo, da vzorci niso bili analizirani.

Gojišče[a]	*PJ-500*			*PJ-50*			*PJ-0*			*IS900*[c]	*IS1245*[c]
Mikroorganizem[b]	*F*	*M*	*A*	*F*	*M*	*A*	*F*	*M*	*A*		
Vzorec											
Kmetija A - maj 2010											
1	-	-	-				-	-	+	+	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-
3							++	+	-	+	-
4							+	-	-	+	+
5	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
7	+	-	+	+	-	+	++	-	-	+	+
8	-	-	+	-	-	++	+	-	-	+	+
9	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
10	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
11	-	-	+	-	-	+	++	++	+	+	+
12	-	-	+	-	-	++	++	-	-	+	-
13	+	-	-	-	-	++	++	+	-	+	+
14	-	-	-	-	-	-	+	++	-	+	+
15	-	-	-	-	-	-				+	-
16	-	-	++	-	-	+				+	+
Kmetija B - maj2010											
1	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
2	+	-	-	-	-	++	-	-	+	+	-
3	-	-	++	-	-	++	++	++	+	+	-
4							++	+	-	+	+
5							+	-	+	+	+
7	+	-	++	-	-	-	+	+	+	+	+
8	+	-	+	-	-	++	+	-	-	+	-
9	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
10A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
11							-	-	-	+	-
12							++	-	-	-	-
13							+	+	+	+	-
14	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
16							-	-	-	-	-
17	-	-	-				-	-	-	-	+
18	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
19	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
20	-	-	-	-	-	+	++	+	-	+	+
21				+	-	++	-	-	-	-	-
22	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
23	+	-	-	+	-	-	+	+	++	+	+
24	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-

se nadaljuje

Nadaljevanje Priloge D1: Kvalitativna mikroskopska karakterizacija vzorcev iz kmetij A in B za vzorčenje maja 2010

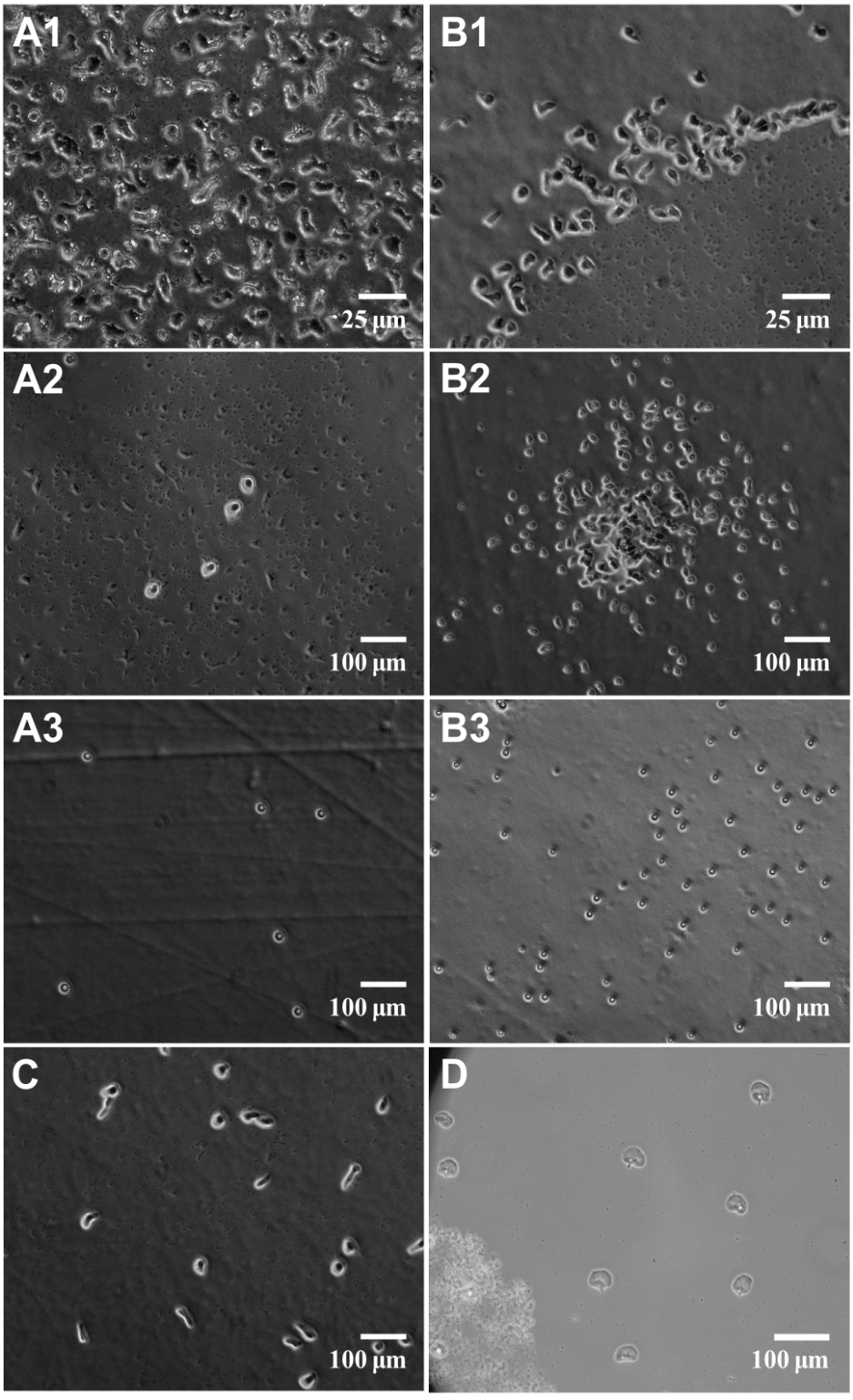
Gojišče[a]	*PJ-500*			*PJ-50*			*PJ-0*			*IS900*[c]	*IS1245*[c]
Mikroorganizem[b]	*F*	*M*	*A*	*F*	*M*	*A*	*F*	*M*	*A*		
Vzorec Kmetija B - maj 2010											
18	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
19	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
20	-	-	-	-	-	+	++	+	-	+	+
21				+	-	++	-	-	-	-	-
22	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
23	+	-	-	+	-	-	+	+	++	+	+
24	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-

[a] Uporabljena gojišča: PJ-500 – PJ agar razmazan s 500 µl suspenzije *E. coli* (OD=0,2, v fiziološki raztopini); PJ-50 – PJ agar razmazan s 50 µl suspenzije *E. coli*; PJ-0 – PJ raztopina z dvemi zrni ovsa (avtoklaviranimi); inkubacija vseh gojišč 7 dni na sobni temperaturi.

[b] Določitev prisotnosti/odsotnosti (+/-) mikroorganizmov glede na fiziološke značilnosti: F – bičkarji, M – migetalkarji, A – amebe; (++) – prisotni na več kot polovici analiziranih vidnih polj; (+) – prisotni na manj kot polovici analiziranih vidnih polj; (-) – niso prisotni na 40 vidnih poljih.

[c] Prisotnost/odsotnost IS*900* in IS*1245* določena z Real-time PCR

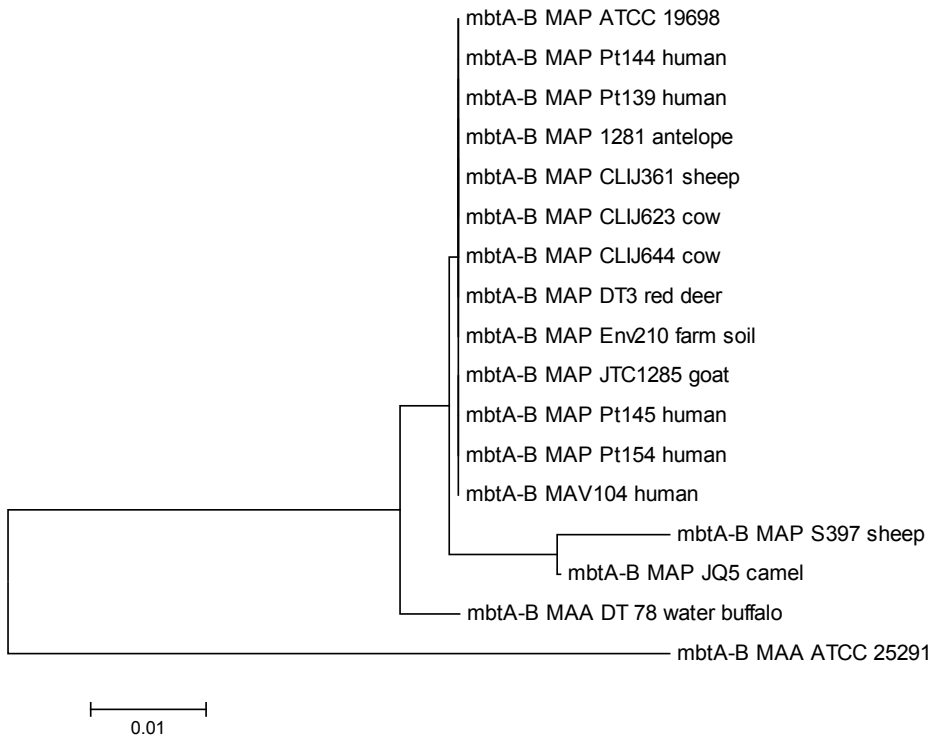
Priloga D2: Slike izoliranih kultur ameb iz okoljskih vzorcev. A1-3 – *Acathamoeba sp.* KC (iz očesne mrežnice); A1- trofozoite v tekočem PYG (400x); A2 – trofozoite na površini NN agarja, prekritim z živo *E. coli* (100x); A3 – ciste na NN agarju (100x); B1-3 – *Hartmannella sp.*; B1 – trofozoite na površini NN agarja, prektirim z živo *E. coli* (400x); B2 – trofozoite, ki se hranijo na koloniji *E. coli*, NN agar (100x), B3 – ciste na NN agarju; C – *Acanthamoeba sp.* B3, trofozoite na NN agarju (100x); D – *Vannella sp.*, trofozoite na NN agarju (100x). Pri vseh slikah smo uporabili fazni kontrast.



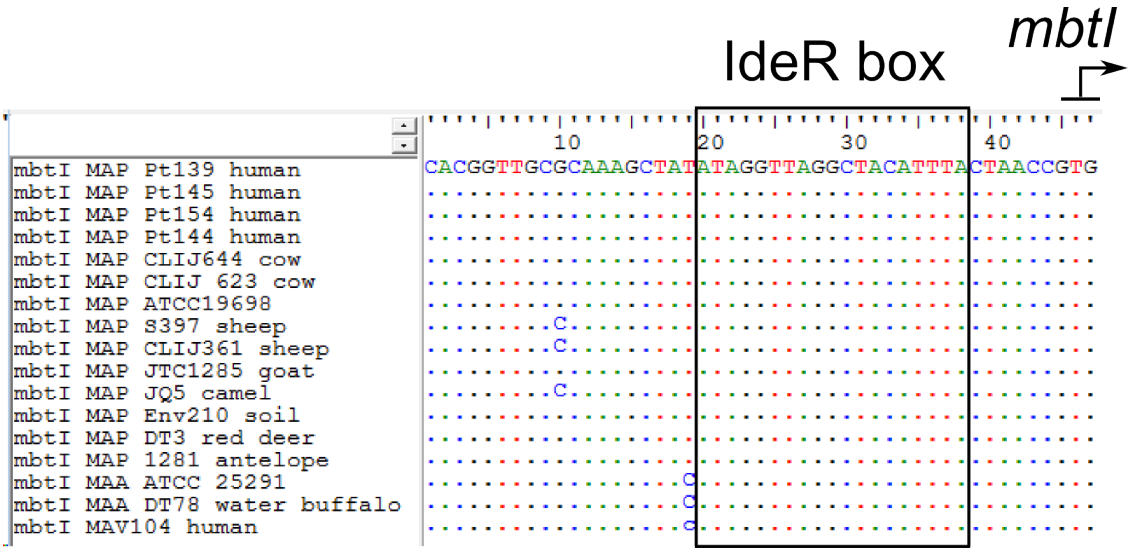
Priloga E:

Filogenetska drevesa in poravnave promotorskih regij mbt operonov in drugih genov pri različnih podvrstah bakterije *M. avium*

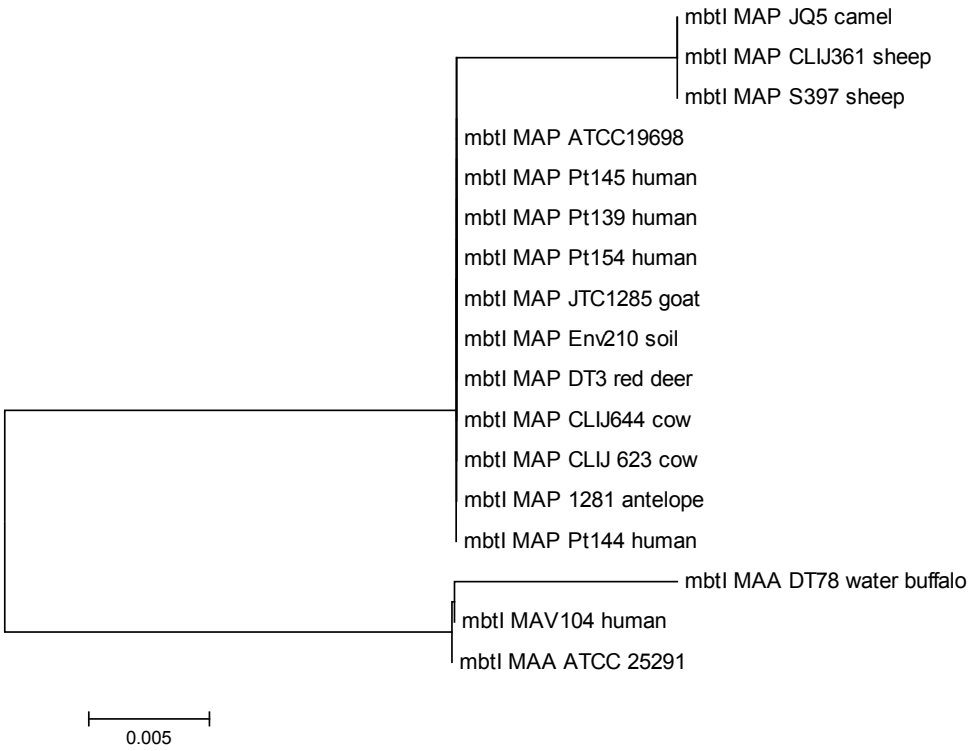
Priloga E1: Filogenetsko drevo promotorske regije *mbtA-mbtB*



Priloga E2: Poravnava IdeR vezavnih mest v promotorju *mbtI* pri različnih podvrstah bakterije *M. avium* in tipih MAP. IdeR vezavno mesto je prikazano v okvirju. S puščicami je označen start kodon za *mbtI*.



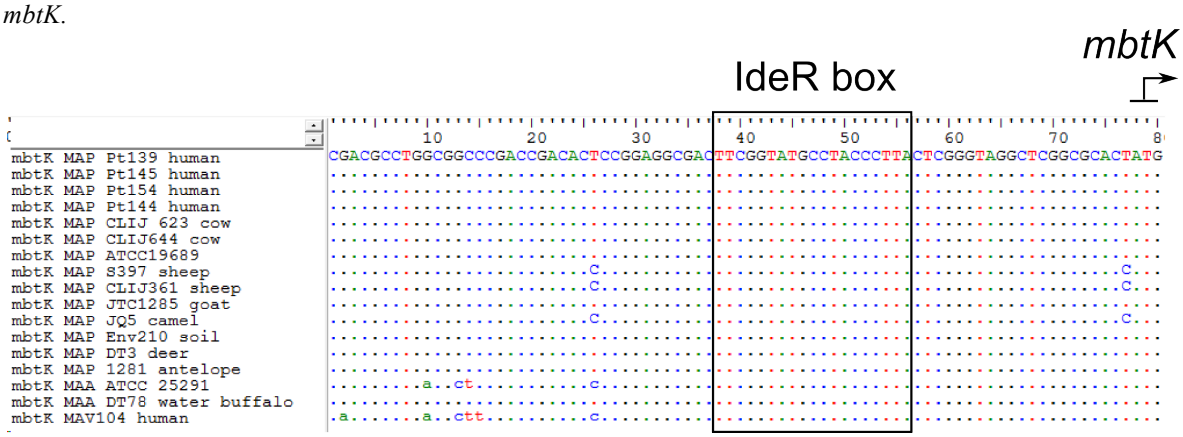
Priloga E3: Filogenetsko drevo promotorske regije *mbtI*



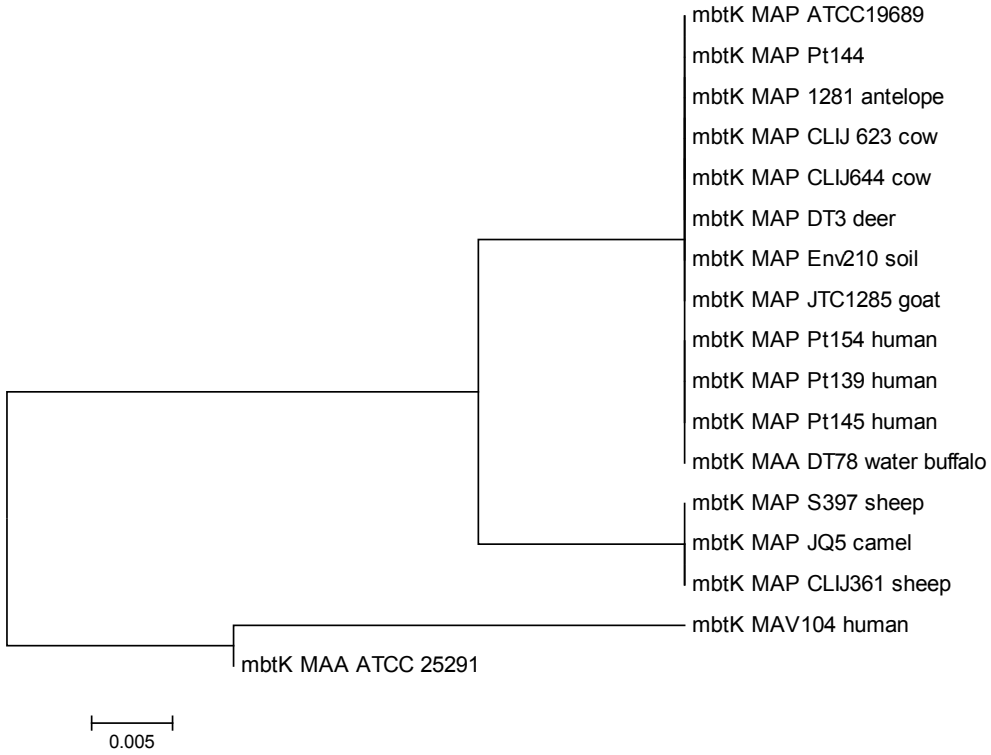
Priloga E4: Filogentesko drevo promotorske regije *mbtL*



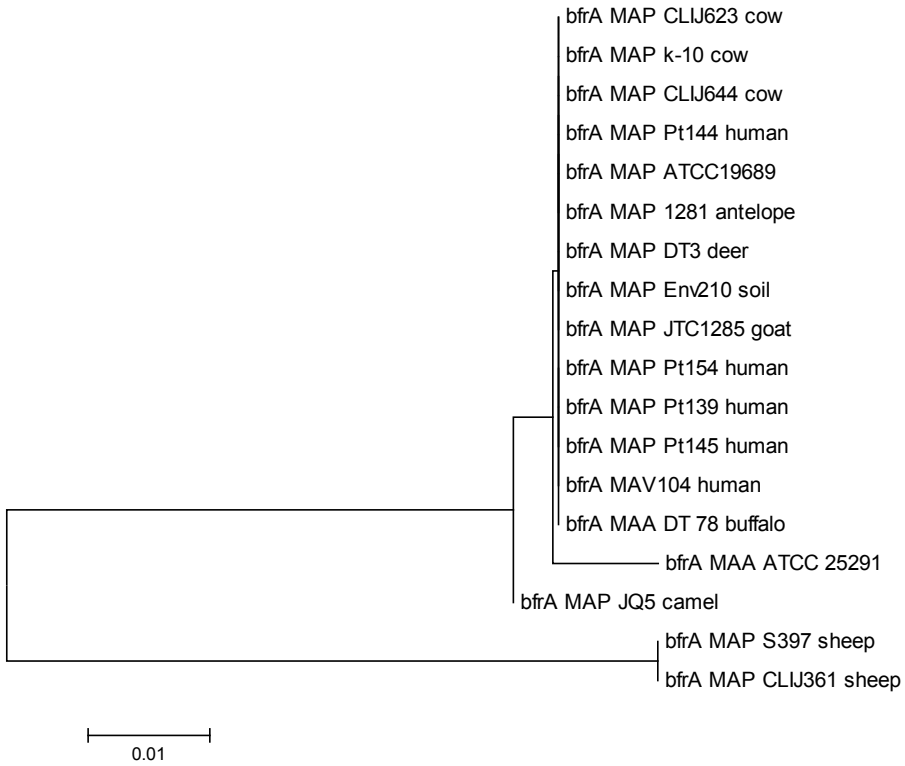
Priloga E5: Poravnava IdeR vezavnih mest v promotorju *mbtK* pri različnih podvrstah bakterije *M. avium* in tipih MAP. IdeR vezavno mesto je prikazano v okvirju. S puščicami je označen start kodon za *mbtK*.



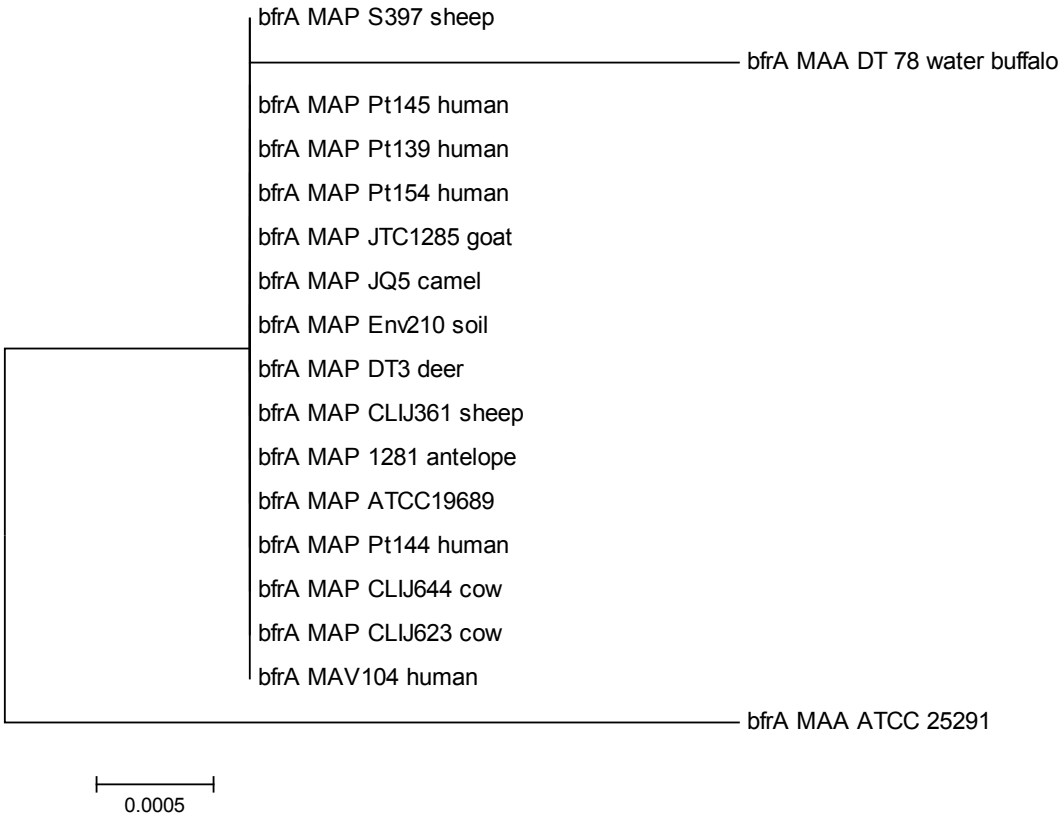
Priloga E6: Filogenetsko drevo promotorske regije *mbtK*



Priloga E7: Filogenetsko drevo promotorske regije *bfrA*



Priloga E8: Filogenetsko drevo celotnih genov *bfrA*



Priloga E9: Poravnava aminokislinskih zaporedij prevedenih *bfrA* genov pri MAP k-10 Genebank ID: NC_002944) ter MAH 104 (Genebank ID: NC_008595). Poravnavo smo, izvedli s ClustalW2 na EMBL-EBI strežniku (http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=clustalw2). Z zvezdico pod poravnavo so prikazane pozicije ujemanja.

```
bfrA_MAP_k-10       MQGDPEVLRLLNEQLTSELTAINQYFLHSKMQDNWGFTELAEHTRAESFDEMRHAEAITD 60
bfrA_MAH_104        MQGDPEVLRLLNEQLTSELTAINQYFLHSKMQDNWGFTELAEHTRAESFDEMRHAEAITD 60
                    ************************************************************

bfrA_MAP_k-10       RILLLDGLPNYQRLFSLRIGQTLREQFEADLAIEYEVMDRLKPAIILCREKQDSTTATLF 120
bfrA_MAH_104        RILLLDGLPNYQRLFSLRIGQTLREQFEADLAIEYEVMDRLKPAIILCREKQDSTTATLF 120
                    ************************************************************

bfrA_MAP_k-10       EQIVADEEKHIDYLETQLELMDKLGVELYSAQCVSRPPS 159
bfrA_MAH_104        EQIVADEEKHIDYLETQLELMDKLGVELYSAQCVSRPPS 159
                    *****************************************
```

Priloga E10. Poravnava aminokislinskih zaporedij prevedenih IdeR genov pri različnih podvrstah in tipih *Mycobacterium avium*. Poravnavo smo izvedli s ClustalW2 na EMBL-EBI strežniku (http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=clustalw2). Z zvezdico pod poravnavo so prikazane pozicije ujemanja. Identifikacijske številke uporabljenih genomov so naštete v poglavju Metode in materiali.

```
MAP_Pt145_human           MNDLVDTTEMYLRTIYDLEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSRMER 50
MAP_Env210_soil           MNDLVDTTEMYLRTIYDLEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSRMER 50
MAP_DT3_deer              MNDLVDTTEMYLRTIYDLEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSRMER 50
MAP_CLIJ644_cow           MNDLVDTTEMYLRTIYDLEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSRMER 50
MAP_CLIJ623_cow           MNDLVDTTEMYLRTIYDLEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSRMER 50
MAP_Pt144_human           MNDLVDTTEMYLRTIYDLEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSRMER 50
MAP_JTC_1285_goat         MNDLVDTTEMYLRTIYDLEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSRMER 50
MAP_ATCC19689             MNDLVDTTEMYLRTIYDLEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSRMER 50
MAP_Pt139_human           MNDLVDTTEMYLRTIYDLEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSRMER 50
MAP_1281_antelope         MNDLVDTTEMYLRTIYDLEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSRMER 50
MAP_CLIJ361_sheep         MNDLVDTTEMYLRTIYDLEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSRMER 50
MAP_JQ5_camel             MNDLVDTTEMYLRTIYDLEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSRMER 50
MAP_S397_sheep            MNDLVDTTEMYLRTIYDLEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSRMER 50
MAA_DT78_water_buffalo    MNDLVDTTEMYLRTIYDLEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSRMER 50
MAA_ATCC25291             MNDLVDTTEMYLRTIYDLEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSRMER 50
MAV104_human              MNDLVDTTEMYLRTIYDLEEEGVTPLRARIAERLDQSGPTVSQTVSRMER 50
                          **************************************************

MAP_Pt145_human           DGLLHVAGDRHLELTDKGRALAVAVMRKHRLAERLLVDVIRLPWEEVHAE 100
MAP_Env210_soil           DGLLHVAGDRHLELTDKGRALAVAVMRKHRLAERLLVDVIRLPWEEVHAE 100
MAP_DT3_deer              DGLLHVAGDRHLELTDKGRALAVAVMRKHRLAERLLVDVIRLPWEEVHAE 100
MAP_CLIJ644_cow           DGLLHVAGDRHLELTDKGRALAVAVMRKHRLAERLLVDVIRLPWEEVHAE 100
MAP_CLIJ623_cow           DGLLHVAGDRHLELTDKGRALAVAVMRKHRLAERLLVDVIRLPWEEVHAE 100
MAP_Pt144_human           DGLLHVAGDRHLELTDKGRALAVAVMRKHRLAERLLVDVIRLPWEEVHAE 100
MAP_JTC_1285_goat         DGLLHVAGDRHLELTDKGRALAVAVMRKHRLAERLLVDVIRLPWEEVHAE 100
MAP_ATCC19689             DGLLHVAGDRHLELTDKGRALAVAVMRKHRLAERLLVDVIRLPWEEVHAE 100
MAP_Pt139_human           DGLLHVAGDRHLELTDKGRALAVAVMRKHRLAERLLVDVIRLPWEEVHAE 100
MAP_1281_antelope         DGLLHVAGDRHLELTDKGRALAVAVMRKHRLAERLLVDVIRLPWEEVHAE 100
MAP_CLIJ361_sheep         DGLLHVAGDRHLELTDKGRALAVAVMRKHRLAERLLVDVIGLPWEEVHAE 100
MAP_JQ5_camel             DGLLHVAGDRHLELTDKGRALAVAVMRKHRLAERLLVDVIGLPWEEVHAE 100
MAP_S397_sheep            DGLLHVAGDRHLELTDKGRALAVAVMRKHRLAERLLVDVIGLPWEEVHAE 100
MAA_DT78_water_buffalo    DGLLHVAGDRHLELTDKGRALAVAVMRKHRLAERLLVDVIGLPWEEVHAE 100
MAA_ATCC25291             DGLLHVAGDRHLELTDKGRALAVAVMRKHRLAERLLVDVIGLPWEEVHAE 100
MAV104_human              DGLLHVAGDRHLELTDKGRALAVAVMRKHRLAERLLVDVIGLPWEEVHAE 100
                          ************************************ *********

MAP_Pt145_human           ACRWEHVMSEDVERRLVKVLNNPTTSPFGNPIPGLLDLGVGPESGAEEAN 150
MAP_Env210_soil           ACRWEHVMSEDVERRLVKVLNNPTTSPFGNPIPGLLDLGVGPESGAEEAN 150
MAP_DT3_deer              ACRWEHVMSEDVERRLVKVLNNPTTSPFGNPIPGLLDLGVGPESGAEEAN 150
MAP_CLIJ644_cow           ACRWEHVMSEDVERRLVKVLNNPTTSPFGNPIPGLLDLGVGPESGAEEAN 150
MAP_CLIJ623_cow           ACRWEHVMSEDVERRLVKVLNNPTTSPFGNPIPGLLDLGVGPESGAEEAN 150
MAP_Pt144_human           ACRWEHVMSEDVERRLVKVLNNPTTSPFGNPIPGLLDLGVGPESGAEEAN 150
MAP_JTC_1285_goat         ACRWEHVMSEDVERRLVKVLNNPTTSPFGNPIPGLLDLGVGPESGAEEAN 150
MAP_ATCC19689             ACRWEHVMSEDVERRLVKVLNNPTTSPFGNPIPGLLDLGVGPESGAEEAN 150
MAP_Pt139_human           ACRWEHVMSEDVERRLVKVLNNPTTSPFGNPIPGLLDLGVGPESGAEEAN 150
MAP_1281_antelope         ACRWEHVMSEDVERRLVKVLNNPTTSPFGNPIPGLLDLGVGPESGAEEAN 150
MAP_CLIJ361_sheep         ACRWEHVMSEDVERRLVKVLNNPTTSPFGNPIPGLLDLGVGPESGAEEAN 150
MAP_JQ5_camel             ACRWEHVMSEDVERRLVKVLNNPTTSPFGNPIPGLLDLGVGPESGAEEAN 150
MAP_S397_sheep            ACRWEHVMSEDVERRLVKVLNNPTTSPFGNPIPGLLDLGVGPESGAEEAN 150
MAA_DT78_water_buffalo    ACRWEHVMSEDVERRLVKVLNNPTTSPFGNPIPGLLDLGVGPESGAEEAN 150
MAA_ATCC25291             ACRWEHVMSEDVERRLVKVLNNPTTSPFGNPIPGLLDLGVGPESGAEEAN 150
MAV104_human              ACRWEHVMSEDVERRLVKVLNNPTTSPFGNPIPGLLDLGVGPESGAEEAN 150
                          **************************************************
```

se nadaljuje

Nadaljevanje Priloge E10: Poravnava aminokislinskih zaporedij prevedenih IdeR genov pri različnih podvrstah in tipih *Mycobacterium avium*

```
MAP_Pt145_human            LVRLTELPSGAPVAVVVRQLTEHVQGDIDLISRLKDAGVVPNARVTVETG 200
MAP_Env210_soil            LVRLTELPSGAPVAVVVRQLTEHVQGDIDLISRLKDAGVVPNARVTVETG 200
MAP_DT3_deer               LVRLTELPSGAPVAVVVRQLTEHVQGDIDLISRLKDAGVVPNARVTVETG 200
MAP_CLIJ644_cow            LVRLTELPSGAPVAVVVRQLTEHVQGDIDLISRLKDAGVVPNARVTVETG 200
MAP_CLIJ623_cow            LVRLTELPSGAPVAVVVRQLTEHVQGDIDLISRLKDAGVVPNARVTVETG 200
MAP_Pt144_human            LVRLTELPSGAPVAVVVRQLTEHVQGDIDLISRLKDAGVVPNARVTVETG 200
MAP_JTC_1285_goat          LVRLTELPSGAPVAVVVRQLTEHVQGDIDLISRLKDAGVVPNARVTVETG 200
MAP_ATCC19689              LVRLTELPSGAPVAVVVRQLTEHVQGDIDLISRLKDAGVVPNARVTVETG 200
MAP_Pt139_human            LVRLTELPSGAPVAVVVRQLTEHVQGDIDLISRLKDAGVVPNARVTVETG 200
MAP_1281_antelope          LVRLTELPSGAPVAVVVRQLTEHVQGDIDLISRLKDAGVVPNARVTVETG 200
MAP_CLIJ361_sheep          LVRLTELPSGAPVAVVVRQLTEHVQGDIDLISRLKDAGVVPNARVTVETG 200
MAP_JQ5_camel              LVRLTELPSGAPVAVVVRQLTEHVQGDIDLISRLKDAGVVPNARVTVETG 200
MAP_S397_sheep             LVRLTELPSGAPVAVVVRQLTEHVQGDIDLISRLKDAGVVPNARVTVETG 200
MAA_DT78_water_buffalo     LVRLTELPSGAPVAVVVRQLTEHVQGDIDLISRLKDAGVVPNARVTVETG 200
MAA_ATCC25291              LVRLTELPSGAPVAVVVRQLTEHVQGDIDLISRLKDAGVVPNARVTVETG 200
MAV104_human               LVRLTELPSGAPVAVVVRQLTEHVQGDIDLISRLKDAGVVPNARVTVETG 200
                           **************************************************

MAP_Pt145_human            PAGVTIVIPGHENVTLPHEMAHAVKVEKV 229
MAP_Env210_soil            PAGVTIVIPGHENVTLPHEMAHAVKVEKV 229
MAP_DT3_deer               PAGVTIVIPGHENVTLPHEMAHAVKVEKV 229
MAP_CLIJ644_cow            PAGVTIVIPGHENVTLPHEMAHAVKVEKV 229
MAP_CLIJ623_cow            PAGVTIVIPGHENVTLPHEMAHAVKVEKV 229
MAP_Pt144_human            PAGVTIVIPGHENVTLPHEMAHAVKVEKV 229
MAP_JTC_1285_goat          PAGVTIVIPGHENVTLPHEMAHAVKVEKV 229
MAP_ATCC19689              PAGVTIVIPGHENVTLPHEMAHAVKVEKV 229
MAP_Pt139_human            PAGVTIVIPGHENVTLPHEMAHAVKVEKV 229
MAP_1281_antelope          PAGVTIVIPGHENVTLPHEMAHAVKVEKV 229
MAP_CLIJ361_sheep          PAGVTIVIPGHENVTLPHEMAHAVKVEKV 229
MAP_JQ5_camel              PAGVTIVIPGHENVTLPHEMAHAVKVEKV 229
MAP_S397_sheep             PAGVTIVIPGHENVTLPHEMAHAVKVEKV 229
MAA_DT78_water_buffalo     PAGVTIVIPGHENVTLPHEMAHAVKVEKV 229
MAA_ATCC25291              PAGVTIVIPGHENVTLPHEMAHAVKVEKV 229
MAV104_human               PAGVTIVIPGHENVTLPHEMAHAVKVEKV 229
                           *****************************
```

Priloga E11: Primerjava IdeR regij med MAP, sev k-10 (Genebank ID: NC_002944) ter MAH 104 (Genebank ID: NC_008595). Črni kvadratki ponazarjajo ujemanje, prazni neujemanje s konsenzom. Skrajno desna kolona prikazuje ujemanje s konsenzov v odstotkih.

IdeR mesto	***MAP k-10***	***Uje-manje*** [%]
konsenz	T T A G G T T A G G C T A A C C T A A	
***mbt-1* operon**		
mbtA (MAP2178)	T T T G G T T A C C C T A T C C T T A	73.7
mbtB (MAP2177c)	T A A G G A T A G G G T A A C C A A A	78.9
mbtI (trpE2)	A T A G G T T A G G C T A C A T T T A	73.7
***mbt-1* operon**		
MAP1551c	T A A G G G T A G G C A T A C C G A A	73.7
mbtK (MAP1552)	T T C G G T A T G C C T A C C C T T A	68.4
mbtL (MAP1555c)	T A A G G C T A G C G T T G C C T A A	68.4
MAP1556	T T A G G C A A C G C T A G C C T T A	73.7
other genes		
bfrA (MAP1595)	T T A G T G G A G T C T A A C C T A A	78.9
	T T A G T G G A G T C T A A C C T A A	78.9
esxG (MAP3783)	T T A G C T T A T G C A A T G C T A A	73.7
	T T A T G C A A T G C T A A C T T C A	68.4
	T C A G G T T A G G G G A G A C T A C	68.4
MAP1559c	A T A G G C A A G G C T G C C C T A A	73.7
pheA (MAP0193)	T T T G T T T A G G T A A G C C T A A	73.7
	T T A G G T A A G C C T A A G T T A A	78.9
irtA (MAP2414c)	T T T G G T A A G G C A A C C C T T A	73.7
Frekvenca baze [%]	88 75 75 94 75 50 50 94 75 63 75 69 81 38 75 81 88 63 94	
	T T A G G T T A G G C T A A C C T A A	

se nadaljuje

Nadaljevanje Priloge E11: Primerjava IdeR regij med MAP, sev k-10 (Genebank ID: NC_002944) ter MAH 104 (Genebank ID: NC_008595)

IdeR mesto	*MAH 104*	*Uje-manje* [%]
konsenz	T T A G G T T A G G C T A A C C T A A	
***mbt-1* operon**		
mbtA (MAV_2008)	T T T G G T T A C C C T A T C C T T A	73.7
mbtB (MAV_2009)	T A A G G A T A G G G T A A C C A A A	78.9
mbtI (MAV_1792)	A T A G G T T A G G C T A C A T T T A	73.7
***mbt-1* operon**		
MAV_2872	T A A G G G T A G G C A T A C C G A A	73.7
mbtK (MAV_2873)	T T C G G T A T G C C T A C C C T T A	68.4
mbtL (MAV_2875)	T A A G G C T A G C C T T G C C T A A	73.7
MAV_2877	T T A G G C A A G G C T A G C C T T A	78.9
other genes		
bfrA (MAV_2833)	T T A G T G G A G T C T A A C C T A A	78.9
	T T A G T G G A G T C T A A C C T A A	78.9
esxG (MAV_4866)	T T A G C T T A T G C A A T G C T A A	73.7
	T T A T G C A A T G C T A A C T T C A	68.4
	T T A G G T T A G G G G A G G C A T C	73.7
MAV_2869	A T A G G C A A G G C T G C C C T A A	73.7
pheA (MAV_0188)	T T T G C T T A G G T A A G C C T A A	73.7
	T T A G G T A A G C C T A A G T T A A	78.9
irtA (MAV_1566)	T T T G G T A A G G C A A C C C T T A	73.7
Frekvenca baze [%]	88 81 75 94 75 50 50 94 81 63 81 69 81 38 75 81 81 56 94	
	T T A G G T T A G G C T A A C C T A A	

Priloga F:

Statistična obdelava podatkov izražanja *mbt* operonov in drugih genov

Priloga F1: Spearmanov korelacijski koeficient za povezave v izražanju med posameznimi geni

Spearmanov korelacijski koeficient (ρ) za MAH 104						
	Kriteriji za statistično pomembnost					
N=8	α=0,05	ρ=0,7381		α=0,01	ρ=0,881	
	mbtA	*mbtB*	*mbtI*	*mbtK*	*mbtL*	*bfrA*
mbtA	1					
mbtB	0,929	1				
mbtI	0,857	0,929	1			
mbtK	0,905	0,952	0,952	1		
mbtL	0,905	0,952	0,952	1,000	1	
bfrA	-0,167	-0,143	-0,310	-0,048	-0,048	1

95% Intervali zaupanja za Spearmanov korelacijski koeficient MAH 104						
	mbtA	*mbtB*	*mbtI*	*mbtK*	*mbtL*	*bfrA*
mbtA	1					
mbtB	0,742-0,982	1				
mbtI	0,530-0,965	0,742-0,982	1			
mbtK	0,667-0,975	0,822-0,988	0,822-0,988	1		
mbtL	0,667-0,975	0,822-0,988	0,822-0,988	1,000	1	
bfrA	-0,697-(+)0,481	-0,684-(+)0,500	-0,767-(+)0,357	-0,630-(+)0,569	-0,630-(+)0,569	1

Spearmanov korelacijski koeficient (ρ) za MAP CLIJ623						
	Kriteriji za statistično pomembnost					
N=14	α=0,05	ρ=0,539		α=0,01	ρ=0,679	
	mbtA	*mbtB*	*mbtI*	*mbtK*	*mbtL*	*bfrA*
mbtA	1					
mbtB	0,758	1				
mbtI	0,829	0,824	1			
mbtK	0,771	0,916	0,851	1		
mbtL	0,710	0,868	0,666	0,793	1	
bfrA	-0,574	-0,714	-0,714	-0,877	-0,631	1

95% Intervali zaupanja za Spearmanov korelacijski koeficient MAP CLIJ623						
	mbtA	*mbtB*	*mbtI*	*mbtK*	*mbtL*	*bfrA*
mbtA	1					
mbtB	0,437-0,908	1				
mbtI	0,578-0,936	0,569-0,935	1			
mbtK	0,462-0,913	0,779-0,970	0,626-0,945	1		
mbtL	0,437-0,888	0,665-0,952	0,273-0,869	0,506-0,922	1	
bfrA	-0,826-(-)0,128	-0,890-(-)0,356	-0,890-(-)0,356	-0,955-(-)0,685	-0,853-(-)0,215	1

se nadaljuje

Nadaljevanje Priloge F1: Spearmanov korelacijski koeficient za povezave v izražanju med posameznimi geni

Statistične razlike v Spearmanovih koeficientih korelacije med MAH 104 in MAP CLIJ623 *(p*- vrednosti)						
	mbtA	*mbtB*	*mbtI*	*mbtK*	*mbtL*	*bfrA*
mbtA	1					
mbtB	0,223	1				
mbtI	0,857	0,374	1			
mbtK	0,379	0,589	0,271	1		
mbtL	0,259	0,327	0,051	0,024	1	
bfrA	0,368	0,165	0,285	0,015	0,197	1

Priloga F2: Studentov *t*-test za razlike med normaliziranimi razmerji analiziranih genov v stacionarni fazi v gojišču brez železa za MAH 104.

	mbtA	*mbtB*	*mbtI*	*mbtK*	*mbtL*	*bfrA*
mbtA	1.000000					
mbtB	0.204591	1.000000				
mbtI	0.906002	0.906002	1.000000			
mbtK	0.405029	0.061462	0.324079	1.000000		
mbtL	0.005865	0.002852	0.003209	0.003782	1.000000	
bfrA	0.014243	0.012703	0.004653	0.003885	0.000806	1.000000

Priloga F3: Studentov *t*-test za razlike med normaliziranimi razmerji analiziranih genov v stacionarni fazi v gojišču brez železa za MAP CLIJ623.

	mbtA	*mbtB*	*mbtI*	*mbtK*	*mbtL*	*bfrA*
mbtA	1,000000					
mbtB	0,000009	1,000000				
mbtI	0,000030	0,000304	1,000000			
mbtK	0,001262	0,000019	0,000194	1,000000		
mbtL	0,086133	0,000003	0,000006	0,000008	1,000000	
bfrA	0,000072	0,000023	0,000358	0,009430	0,000001	1,000000

Priloga F4: Studentov *t*-test in *p*-vrednosti za razlike v povečanju izražanja med analiziranimi geni v gojišču brez železa med MAH 104 in MAP CLIJ623.

gen	*mbtA*	*mbtB*	*mbtI*	*mbtK*	*mbtL*	*bfrA*
t-test	0,004	0,011	0,665	0,075	0,145	0,008

Priloga F5: Studentov *t*-test in *p* – vrednosti za razlike v povečanju izražanja med analiziranimi geni v gojišču brez železa pri MAH 104

	mbtA	*mbtB*	*mbtI*	*mbtK*	*mbtL*	*bfrA*
mbtA	1					
mbtB	0,428831	1				
mbtI	0,111316	0,091251	1			
mbtK	0,048645	0,041122	0,569229	1		
mbtL	0,669227	0,888093	0,160708	0,169247	1	
bfrA	0,000349	0,000465	0,00433	0,000814	0,004278	1

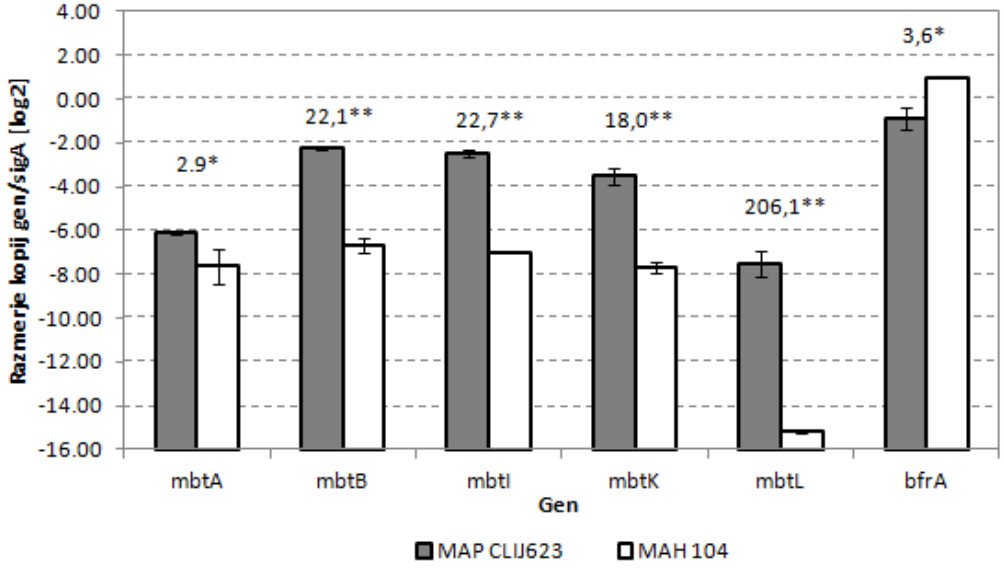
Priloga F6. Studentov *t*-test in *p* – vrednosti za razlike v povečanju izražanja med analiziranimi geni v gojišču brez železa pri MAP CLIJ623

	mbtA	*mbtB*	*mbtI*	*mbtK*	*mbtL*	*bfrA*
mbtA	1					
mbtB	0,0298	1				
mbtI	0,0140	0,3037	1			
mbtK	0,3588	0,2594	0,1055	1		
mbtL	0,0480	0,4916	0,9897	0,1829	1	
bfrA	0,0001	0,0000	0,0000	0,0002	0,0002	1

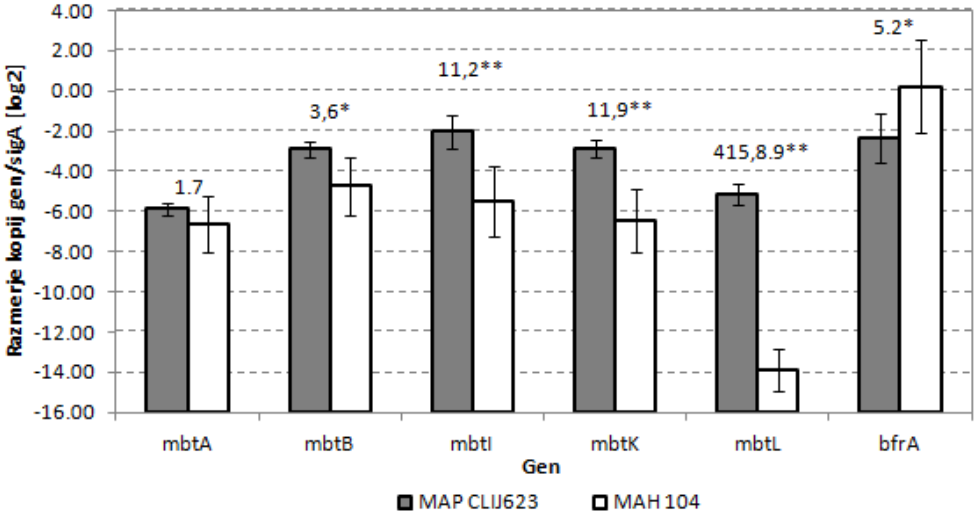
Priloga G:

Primerjava ravni analiziranih genov v stacionarni fazi med MAH 104 in MAP CLIJ623

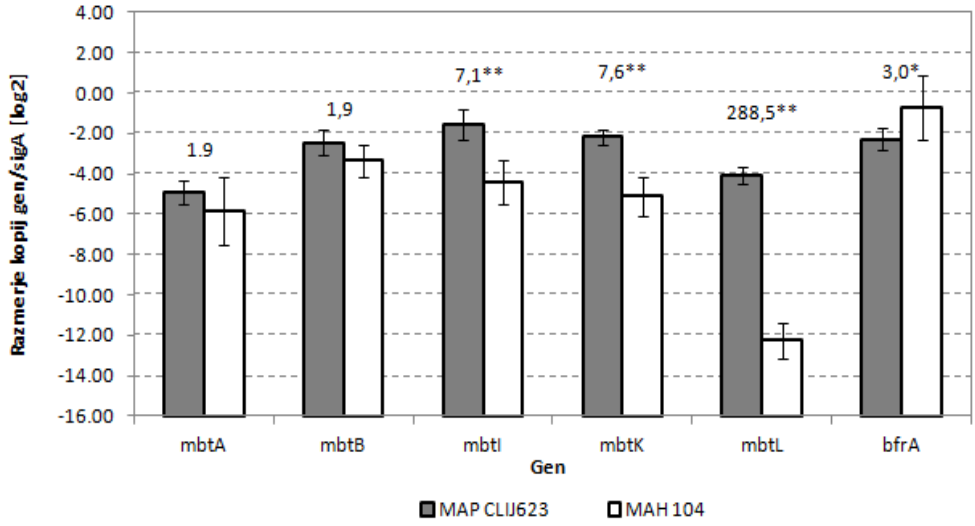
Priloga G1: Primerjava ravni analiziranih genov v <u>stacionarni fazi</u> med MAH 104 in MAP CLIJ623 v gojišču <u>z železom</u>, Razmerje so prikazana v logaritemski skali z dvojiško osnovo, Nad stolpci so podani faktorji razlike med MAH in MAP, asterisk pa označuje statistično pomembnost (t-test): (**) – p<0,005, (*) – p<0,05



Priloga G2: Primerjava ravni analiziranih genov v <u>lag fazi</u> med MAH 104 in MAP CLIJ623 v gojišču <u>z železom</u>. Razmerje so prikazana v logaritemski skali z dvojiško osnovo, Nad stolpci so podani faktorji razlike med MAH in MAP, asterisk pa označuje statistično pomembnost (t-test): (**) – p<0,005, (*) – p<0,05.



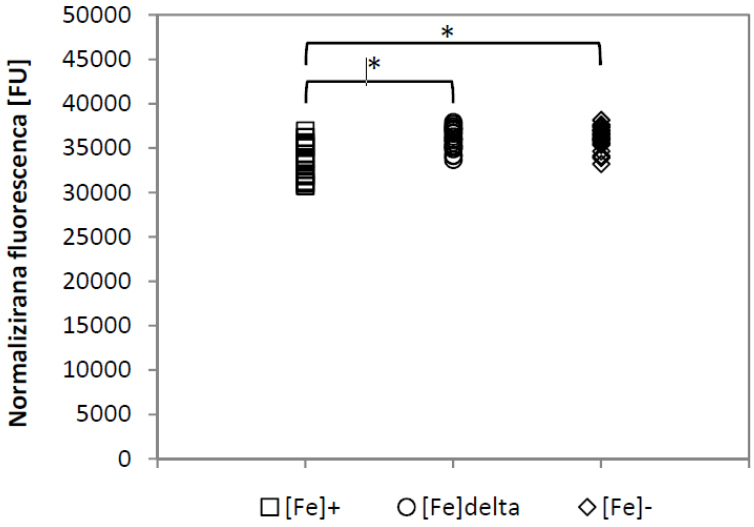
Priloga G3: Primerjava ravni analiziranih genov v <u>lag fazi</u> med MAH 104 in MAP CLIJ623 v gojišču <u>brez železa</u>. Razmerje so prikazana v logaritemski skali z dvojiško osnovo, Nad stolpci so podani faktorji razlike med MAH in MAP, asterisk pa označuje statistično pomembnost (t-test): (**) – p<0,005, (*) – p<0,05



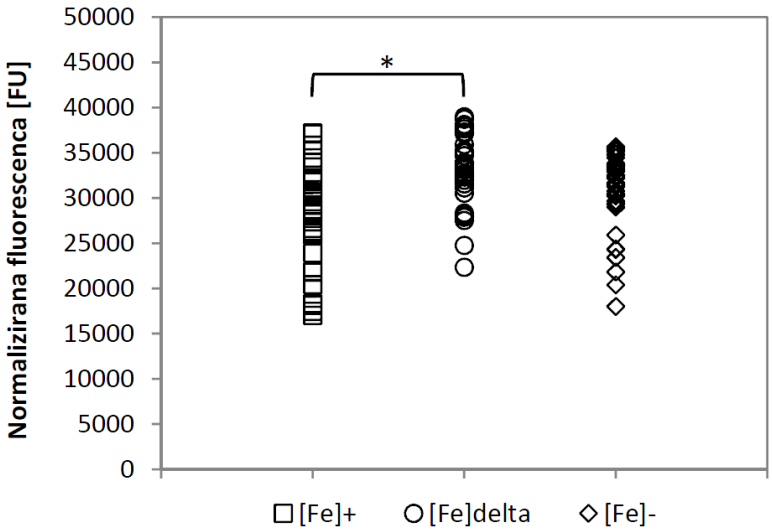
Priloga H:

Rast MAH 104 in MAP 468/09 v pozitivnih kontrolah (brez antibiotikov) pri različnih eksperimentalnih pogojih, določena z resazurinsko metodo

Priloga H1. Primerjava rasti MAH 104 v pozitivnih kontrolah (brez antibiotikov). $[Fe]_+$ - pogoji normalne dostopnosti železa; $[Fe]_+$ - pogoji nizke dostopnosti železa; [Fe]. pogoji 'akutnega' pomanjkanja železa ($[Fe]_\Delta$). Z asteriskom so označene statistično pomembne razlike ($p<0,01$).



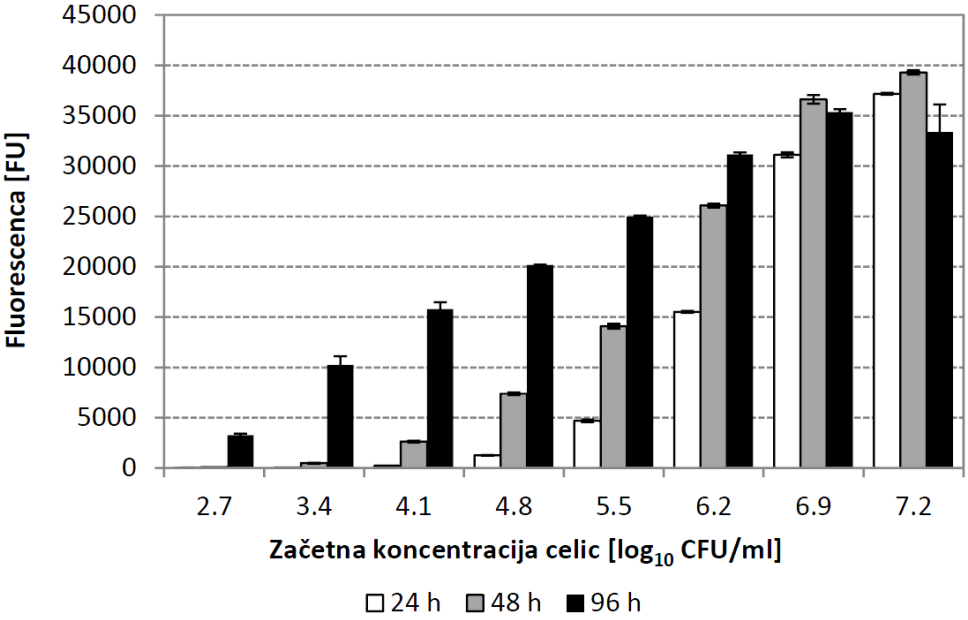
Priloga H2. Primerjava rasti MAP 468/09 v pozitivnih kontrolah (brez antibiotikov). $[Fe]_+$ - pogoji normalne dostopnosti železa; $[Fe]_+$ - pogoji nizke dostopnosti železa; [Fe]. pogoji 'akutnega' pomanjkanja železa ($[Fe]_\Delta$). Z asteriskom so označene statistično pomembne razlike ($p<0,01$).



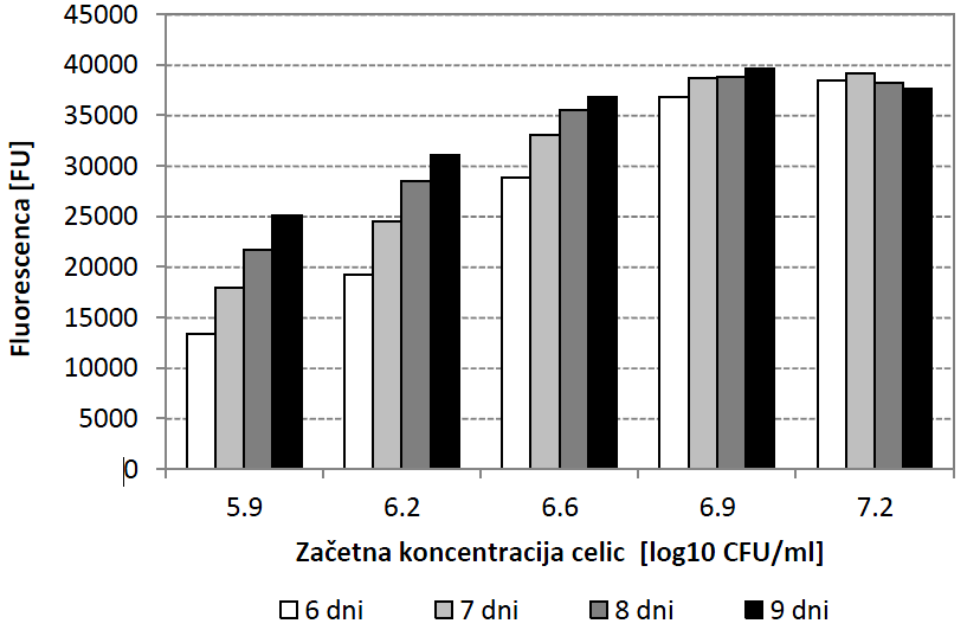
Priloga I:

Preliminarni poskusi za izbiro optimalnih časov inkubacije in koncentracije začetne kulture MAH 104 in MAP 468/09 za merjenje inhibicije rasti z resazurinom

Priloga I1: Preliminarni poskusi za izbiro optimalnih časov inkubacije in koncentracije začetne kulture MAH 104 za merjenje inhibicije rasti z resazurinom. Različno obarvani stolpci predstavljajo različne čase inkubacije na 37 °C.



Priloga I2. Preliminarni poskusi za izbiro optimalnih časov inkubacije in koncentracije začetne kulture MAP 468/09 za merjenje inhibicije rasti z resazurinom. Različno obarvani stolpci predstavljajo različne čase inkubacije na 37 °C.



Priloga J:

Razlike v odpornosti na antibiotike med MAP 468/09 in MAH 104 pri različnih pogojih dostopnosti železa

Antibiotik	*Razmerje MIC [log_2][a]*		
	$[Fe]_+$	*$[Fe]_\Delta$*	*$[Fe]_-$*
INH	2,0*	3,0*	4,0*
OXA	<-6,3*	< -8,3*	< -9,3*
RIF	-4,4*	-2,7*	-3,0*
STR	-3,7*	-3,7*	-3,7*
6-MP	< -4,0*	< -5,0*	< -7,0*
AZM	-4,0*	-4,0*	-4,0*
PAS	< -1,0*	< -2,0*	< -6,0*
EMB	< -5,0*	< -7,0*	< -8,0*
LVX	-2,2*	-2,2*	-3,2*
DCS	-0,4	-0,4	-1,4
3-NPA	-4,1*	-5,1*	-7,1*
SAL	na[b]	na	na

[a] razlika v MIC med MAP 468/09 in MAH 104 je podana kot log_2 razmerja median MIC vrednosti MAP/MAH; negativna vrednost pomeni nižji MIC pri MAP v primerjavi z MAH; kjer so bile MIC vrednosti pri eni izmed podvrst izven testiranega koncentracijskega območja, smo za izračun razmerja uporabili zadnjo (najvišjo) testirano vrednost in izračunano razmerje zapisali kot »>« ali »<«; statistično značilne razlike ($p<0,05$, Studentov *t*-test) so označene z asteriskom (*).

[b] na – razmerja ni bilo mogoče izračunati, ker so bile MIC vrednosti pri obeh podvrstah izven testiranih koncentracijskih območij