

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Simon BLATNIK

**KARAKTERIZACIJA PROTEINOV BAKTERIJE
Mycoplasma cynos Z MONOKLONSKIMI
PROTITELESI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Simon BLATNIK

**KARAKTERIZACIJA PROTEINOV BAKTERIJE *Mycoplasma cynos*
Z MONOKLONSKIMI PROTITELESI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CHARACTERISATION OF PROTEINS OF *Mycoplasma cynos* WITH
MONOCLONAL ANTIBODIES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

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

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Mojca Narat, za somentorico dr. Irena Oven ter za recenzenta dr. Dušan Benčina.

Mentorica: prof. dr. Mojca Narat

Somentorica: dr. Irena Oven

Recenzent: dr. Dušan Benčina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Mojca NARAT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: asist. dr. Irena OVEN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: znan. svet. dr. Dušan BENČINA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

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

Simon BLATNIK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.27.083: 575.887(043)=163.6
KG	<i>Mollicutes/mikoplazme/Mycoplasma cynos</i> /imunogeni proteini /monoklonska protitelesa/molekularna imunologija/hibridomska tehnologija
AV	BLATNIK, Simon
SA	NARAT, Mojca (mentorica)/OVEN, Irena (somentorica)/BENČINA, Dušan (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2012
IN	KARAKTERIZACIJA PROTEINOV BAKTERIJE <i>Mycoplasma cynos</i> Z MONOKLONSKIMI PROTITELESI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 69 str., 12 pregl., 11 sl., 1 pril., 117 vir.
IJ	sl
JI	sl/an
AI	<p><i>Mycoplasma cynos</i> je bakterija, ki povzroča bolezni pljuč pri psih, večinoma v povezavi z drugimi patogenimi mikroorganizmi. V postopku hibridomske tehnologije je bila miška Balb/c imunizirana s celicami <i>M. cynos</i> in njihovimi topnimi proteini. Iste bakterijske celice so bile uporabljene v prvem presejalnem testu ELISA, s katerim so bili odbrani pridobljeni hibridomi, ki so proizvajali specifična protitelesa proti <i>M. cynos</i> (sev 896). Te hibridome smo klonirali in pri nadalnjih testiranjih kot antigen uporabili raztopino topnih proteinov <i>M. cynos</i>. Reakcije pri primarnem testu ELISA so bile bolj intenzivne in številčnejše, kar je bilo pričakovati, glede na to, da so bili pri prvotnem testu ELISA v naboru vsi celični proteini bakterije, v drugem testu pa le vodotopna frakcija. Ugotovili smo, da kloni rastejo bolje oz. enako hitro v gojišču brez seruma (SFM) kot v gojišču DMEM s serumom. Klon 8F12G10 je tudi po daljšem obdobju gojenja in večjem številu presajanj proizvajal mišje IgG. Ugotovili smo, da je bilo za miško Balb/c imunogenih 15 topnih proteinov z molskimi masami: 12, 16, 22, 23, 24, 25, 27, 37, 38, 40, 45, 49, 55, 60, 65, 67 in 95 kDa. Proteini z molskimi masami 12 in 65 kDa so površinski proteini, kar je bilo dokazano s posredno encimsko imunske metodo na nativnih kolonijah. Hibridoma 8D11G6 in 8F12G6 sta proizvajala specifična protitelesa IgG proti proteinom <i>M. cynos</i> z molskima masama 12 in 24 kDa.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 577.27.083: 575.887(043)=163.6
CX	<i>Mollicutes/Mycoplasma/Mycoplasma</i> proteins/monoclonal antibodies/molecular <i>cynos/immunogenic</i> technology immunology/hybridoma
AU	BLATNIK, Simon
AA	NARAT, Mojca (supervisor)/OVEN, Irena (co-advisor)/BENČINA, Dušan (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2012
TI	CHARACTERISATION OF PROTEINS OF <i>Mycoplasma cynos</i> WITH MONOCLONAL ANTIBODIES
DT	Graduation thesis (university studies)
NO	XII, 69 p., 12 tab., 11 fig., 1 ann., 117 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p><i>Mycoplasma cynos</i> is a bacterium, which in association with other pathogens (in most cases) causes lung diseases. In the procedure of hybridoma technology Balb/c mouse was first inoculated with whole cells of <i>M. cynos</i> and then with its soluble proteins. The same bacterial cells were used in the first selection of hybridomas (ELISA), where hybridomas were selected, which produce specific antibodies against <i>M. cynos</i> (strain 896). These hybridomas were cloned. In further tests soluble proteins of <i>M. cynos</i> were used as antigens. As expected, in first screening assay reactions were stronger and more numerous, because the primary testing included all bacterial proteins, not just soluble ones. Further testing included only soluble fraction. We found that hybridomas grew equally or even better in serum free medium (SFM) than in DMEM medium with serum. Hybridoma 8F12G10 was stable during long period of culturing and produced mouse IgG. We determined that 15 proteins of different molecular weights were immunogenic for Balb/c mouse: 12, 16, 22, 23, 24, 25, 27, 37, 38, 40, 45, 49, 55, 60, 65, 67 and 95 kDa. Proteins of 12 and 65 kDa are surface proteins, which was determined with indirect immunoperoxidase assay on native colonies. Hybridomas 8D11G6 and 8F12G6 produced specific IgG against <i>M. cynos</i> proteins of 12 and 24 kDa.</p>

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	V
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PREGLEDNIC.....	X
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RAZRED <i>MOLLICUTES</i>	3
2.1.1 Evolucija <i>Mollicutes</i>	3
2.1.2 Taksonomija <i>Mollicutes</i>	4
2.1.3 Genetika razreda <i>Mollicutes</i>	6
2.2 BAKTERIJE RODU <i>MYCOPLASMA</i>	6
2.2.1 Ekologija mikoplazem.....	7
2.2.2 Identifikacija mikoplazem	8
2.2.3 Taksonomija mikoplazem.....	8
2.2.4 Metabolizem mikoplazem.....	10
2.2.5 Membrana mikoplazem	10
2.2.6 Genetski zapisi rodu <i>Mycoplasma</i>	11
2.2.7 Razmnoževanje mikoplazem	13
2.2.8 Patogeneza mikoplazem.....	13
2.2.9 Antigenska spremenljivost mikoplazem.....	14
2.3 MIKOPLAZME, IZOLIRANE IZ PSOV	15
2.3.1 Izolacija in identifikacija	16
2.3.2 Taksonomija mikoplazem izoliranih iz psov.....	17
2.4 VRSTA <i>MYCOPLASMA CYNOS</i>	17
2.4.1 Obolenja pri psih povezana z <i>Mycoplasmo cynos</i>	19
2.5 IMUNOGENE MOLEKULE BAKTERIJ	20
2.5.1 Imunogene molekule mikoplazem	20
2.5.2 Encim nevraminidaza (sialidaza).....	21
2.6 MONOKLONSKA PROTITELESA	21
2.6.1 Pridobivanje monoklonskih protiteles – hibridomska tehnologija.....	22

3 MATERIALI IN METODE	23
3.1 IMUNIZACIJA MIŠKE	23
3.2 DELO S HIBRIDOMI	23
3.2.1 Gojenje klonov	24
3.2.2 Vpliv gojitvenega medija na rast hibridomov	24
3.2.3 Shranjevanje klonov.....	25
3.3 PRESEJALNI TEST	25
3.3.1 Test ELISA.....	25
3.4 IZOLACIJA MAB IZ SUPERNATANTOV HIBRIDOMOV	27
3.4.1 Obarjanje in koncentriranje protiteles	27
3.4.2 Čiščenje protiteles.....	28
3.5 TESTIRANJE IN DELNA KARAKTERIZACIJA PROTITELES <i>M. CYNOS</i>.....	28
3.5.1 Detekcija protiteles z metodo DIBA	28
3.5.1.1 Encimsko imunski test – DIBA za dokaz imunoglobulinov v supernatantih hibridomov	28
3.5.1.2 Encimsko imunski test – DIBA za dokaz specifičnih protiteles	29
3.5.2 Elektroforeza SDS-PAGE.....	29
3.5.2.1 Priprava posodice za vливанje гела	29
3.5.2.2 Priprava гела за elektroforeзу SDS-PAGE	30
3.5.2.3 Priprava bakterijskih proteinov za elektroforeзу SDS-PAGE	32
3.5.2.4 Referenčni markerji	32
3.5.2.5 Priprava пуфра за elektroforeзу SDS-PAGE	33
3.5.2.6 Pogoji elektroforeзе SDS-PAGE	33
3.5.3 Optimizacija pogojev za elektroforeзу SDS-PAGE	33
3.6 BARVANJA PROTEINOV <i>M. CYNOS</i>.....	33
3.6.1 Barvanje z barvilom Coomassie blue	33
3.6.2 Barvanje z barvilom Ponceau S rdeče	34
3.7 DETEKCIJA SPECIFIČNIH REAKCIJ S PROTITELESI.....	34
3.7.1 Prenos proteinov <i>M. cynos</i> po Westernu	34
3.7.2 Specifične reakcije med proteini na membrani in protitelesi.....	36
3.8 SHEMA POSKUSA	38
4 REZULTATI.....	39
4.1 SELEKCIJA HIBRIDOMOV	39
4.2 SELEKCIJA HIBRIDOMSKIH KLONOV PO VEČ KRITERIJIH	40
4.2.1 Primarna selekcija klonov s testom ELISA	40
4.2.2 Karakterizacija klonov glede na rast.....	42
4.2.3 Selekcija klonov glede na njihovo produktivnost monoklonskih protiteles	43
4.2.4 Selekcija hibridomskih klonov glede na test DIBA.....	43
4.2.4.1 Encimsko imunski test (DIBA za dokazovanje mišjih IgG)	43

4.2.4.2	Encimsko imunski test (DIBA za dokazovanje specifičnih protiteles) ...	44
4.2.5	Selekcija klonov glede na ohranjanje sposobnosti sinteze specifičnih monoklonskih protiteles	45
4.3	OPTIMALNA KONCENTRACIJA VZORCA ANTIGENA <i>M. CYNOS</i> ZA PRENOS NA MEMBRANO	46
4.4	PROFIL PROTEINOV <i>M. CYNOS</i>	47
4.5	REAKCIJE MONOKLONSKIH PROTITELES S PROTEINI <i>M. CYNOS</i>	48
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	51
5.1	RAZPRAVA.....	51
5.2	SKLEPI.....	55
6	POVZETEK.....	56
7	VIRI	57
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO SLIK

Slika 1: Primerjava števila genov bakterij <i>H. influenzae</i> , <i>M. pneumoniae</i> , in <i>M. genitalium</i> (Razin in sod., 1998)	12
Slika 2: <i>Mycoplasma cynos</i> , sev NC 10142 (Windsor in Windsor, 2007)	18
Slika 3: Gel za SDS-PAGE elektroforezo (Protein Methods, 2011).....	31
Slika 4: Prenos proteinov iz gela na membrano (Western blot, 2011).....	36
Slika 5: Shematski prikaz zaporedja vseh testov.....	38
Slika 6: Test DIBA za dokazovanje mišjih IgG.	44
Slika 7: Test DIBA za dokazovanje specifičnih protiteles	45
Slika 8: Posredni imunski test DIBA (dokaz stabilnosti klonov).....	45
Slika 9: Ugotavljanje optimalne koncentracije antiga <i>M. cynos</i> za prenos na membrano	46
Slika 10: Proteinski profil proteinov <i>M. cynos</i> po elektroforezi SDS-PAGE.	47
Slika 11: Reakcije proteinov <i>M. cynos</i> (896) pri analizi imunoblot.....	49

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sistematika debla <i>Tenericutes</i> (Ludwig in sod., 2011: 23; NCBI, 2011).....	5
Preglednica 2: Filogenetske skupine in gruče znotraj razreda <i>Mollicutes</i> (Ludwig in sod., 2011)	9
Preglednica 3: Biokemijske karakteristike <i>M. cynos</i> v primerjavi z nekaterimi drugimi sevi mikoplazem izoliranih iz psov (Rosendal, 1973: 52).....	18
Preglednica 4: Sestava 15 % ločevalnega gela	30
Preglednica 5: Sestava 4 % koncentracijskega gela	31
Preglednica 6: Sestava nanašalnega pufra	32
Preglednica 7: Rezultati testa ELISA in testa Imunoblot – IBL (preliminarno testiranje hibridomov)	39
Preglednica 8: Test ELISA preliminarno kloniranih hibridomov	40
Preglednica 9: Test ELISA – testiranje supernatantov klonov pridobljenih iz štirih hibridomov	41
Preglednica 10: Dinamika rasti klonov v dveh različnih gojiščih	42
Preglednica 11: Rezultati testa ELISA supenatantov klonov gojenih v DMEM, 10 % FBS in v mediju SFM po koncentriranju in čiščenju z dializnim postopkom	43
Preglednica 12: Celoten pregled rezultatov testiranj supernatantov hibridomov	50

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Vzorci potovanja lis referenčnega standarda SM0671 pri različnih zamreženostih gelov za elektroforezo (Thermo Scientific. 2012)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABTS	(2,2'-azino-di-(3-etylbenziazol-6-sulfonska kislina))
APS	<u>a</u> monijev <u>p</u> ersulfat
CAPS	<i>N</i> -cikloheksil-3-aminopropansulfonska kislina
CIRD	nalezljiva pasja dihalna bolezen (<u>c</u> anine <u>i</u> nfectious <u>r</u> espiratory <u>d</u> isease)
DIBA	točkovni encimsko imunski test (<u>d</u> ot <u>i</u> mmunob <u>b</u> inding <u>a</u> ssay)
DMEM	osnovni rastni medij za gojenje sesalskih celic <i>in vitro</i> , ki sta ga modificirala Dubleccoo in Voght (<u>D</u> ubleccoo's <u>m</u> odified <u>E</u> agle's <u>m</u> edium)
EBP	pufer za prenos na membrano (<u>e</u> lektrobl <u>o</u> t <u>b</u> uffer)
ELISA	encimsko imunski test za dokazovanje specifičnih protiteles ali antigenov (<u>e</u> nhyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay)
EMP	<u>E</u> mbden <u>M</u> ayerhof <u>P</u> arnasova metabolna pot glikolize
FBS	fetalni goveji serum (<u>f</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum)
HAT	medij <u>h</u> ipoksantin, <u>a</u> minopterin in <u>t</u> imidin
IIPA	posredna encimsko imunska metoda (indirect immunoperoxidase assay)
kDa	<u>k</u> ilodalton, enota za atomske ali molekulske mase
NSO	celična linija mišjih mielomskih celic
PBS	fosfatni pufer (<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PVDF	polivinil difluorid (polyvinyl difluoride)
SFM	gojišče brez seruma (<u>s</u> erum <u>f</u> ree <u>m</u> edium)
TEMED	<u>t</u> etrametiletilendiamin (ali tudi TMEDA)

1 UVOD

Mollicutes so najmanjše prostoživeče bakterije, ki nimajo celične stene (»*mollis*« pomeni mehak in »*cutis*« pomeni koža) (Edward in Freundt, 1967). Taksonomija razreda *Mollicutes* kot tudi rodu *Mycoplasma* se je zaradi vedno novih odkritij spremenjala (Whithford in sod., 1994; Ludwig in sod., 2011; Wolfgang in sod., 2009). Tekom evolucije so *Mollicutes* izgubljale veliko genetskega materiala (Razin in sod., 1998) in zato je njihov metabolizem zelo okrnjen (Miles, 1992). *Mollicutes* imajo zelo majhne genome in posledično sintetizirajo malo proteinov (Razin in sod., 1998; Sirand-Pugnet in sod., 2007). Mikoplazme so pleomorfne in prehajajo skozi filtre z velikostjo por 200 nm (Chalker, 2005). So večinoma obvezni paraziti in komenzali predvsem sluznic in povzročajo kronična obolenja in avtoimunske reakcije (Razin in Jacobs, 1992; Razin in sod., 1998). *Mollicutes* so popolnoma odvisne od pogojev v mikrookolju (; Razin in sod., 1998). Identifikacija je včasih potekala s pomočjo gojenja, seroloških testov in biokemijskih testov, danes pa prevladujejo molekularne tehnike (Shlomo, 2003; Thompson in sod., 2011; Spergser in Rosengarten., 2007; Chalker in sod., 2002). Nimajo tipičnih virulentnih dejavnikov, razen adhezinov (Pilo in sod., 2005). Pomembni so lipoproteini, ki so tudi imunogeni in zelo spremenljivi (Rottem, 2003; Razin in sod., 1998). Izločajo tudi nekatere zunajcelične proteine (Minion in sod., 1993).

Mikoplazme pri psih so verjetno odkrili že leta 1934 (Shoetensack), vendar takrat mikoplazem še niso poznali in so bili mnenja, da gre za virus. Pojem pasje mikoplazme se je uveljavil leta 1975 (Rosendal). Danes je področje pasjih mikoplazem že bolj raziskano. Poznanih je precej vrst pasjih mikoplazem, ki povzročajo veliko različnih bolezni (Chalker, 2005).

M. cynos je pasja mikoplazma in kot del naravne flore prisotna v zgornjih delih dihal. Lahko je primarno patogen mikroorganizem, še večkrat pa del mešane okužbe pri boleznih dihal pri psih. Bakterija povzroča težave predvsem v zavetiščih za pse in pasjih azilih.

Protitelesa so komponenta imunskega sistema. Proizvajajo jih limfociti B in so produkt ene klonske linije celic B (Nelson in sod., 2000). S hibridomsko tehnologijo uspešno pridobivamo monoklonska protitelesa *in vitro* tako za farmacevtske kot tudi diagnostične in analitske namene (Nelson in sod., 2000; Vozelj, 2000).

To diplomsko delo prispeva k boljšemu poznavanju proteinov *M. cynos*. Delo sem pričel v laboratoriju na stopnji kloniranja hibridomov, ki so sintetizirali IgG proti antigenom *M. cynos*. Stopnje imunizacije ter fuzije z mielomskimi celicami so že bile izvršene.

1.1 NAMEN DELA

Namen dela je bil ugotoviti, kateri izmed proteinov bakterije *Mycoplasma cynos* so imunogeni in pridobiti vsaj nekaj stabilnih klonov, ki bi proizvajali specifična monoklonska protitelesa. Najprej smo s testoma ELISA in DIBA ugotovili, kateri od hibridomov proizvajajo monoklonska protitelesa. S prenosom proteinov *M. cynos* po Westernu in imunodetekcijo smo ugotavljali za katere proteine *M. cynos* so monoklonska protitelesa specifična.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAZRED *Mollicutes*

Mollicutes so bakterije, ki so tekom evolucije izgubile sposobnost biosinteze celične stene. Ime razreda *Mollicutes* je bilo sprejeto leta 1967, in sicer na predlog Edwarda D. G. iz leta 1955. Beseda *Mollicutes* je sestavljanka dveh besed; »*mollis*« pomeni mehak in »*cutis*« pomeni koža. Ime je razred dobil zaradi dveh osnovnih lastnosti vseh predstavnikov: nesposobnosti biosinteze celične stene in plastičnosti membrane (Edward in Freundt, 1967).

2.1.1 Evolucija *Mollicutes*

Mollicutes so se od svojega prednika odcepile pred 600 milijoni let. Pred okoli 470 milijoni let so se razdelile na dve veliki veji: vejo AAP, ki zajema debla *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma* in *Phytoplasma*, ter na vejo SEM, ki zajema rodove *Spiroplasma*, *Mesoplasma*, *Ureaplasma* in *Mycoplasma* (Maniloff, 2002). Velikost genoma organizma, iz katerega sta se razvili veji SEM in AAP, je bila med 1,7 in 2,0 Mbp (Maniloff, 1996). Na filogenijo genomov mikoplazem je lahko vplivalo več dejavnikov: krajši genom zmanjša tako podvojevalni čas (večje število potomcev) kot tudi energetsko obremenitev v okoljih s prehranskimi omejitvami; izgubljanje genomskeh sekvenc z delecijami, če se te delecije niso mogle popraviti z rekombinacijami z divjimi tipi. Na redukcijsko filogenijo so lahko vplivali vsi od navedenih dejavnikov ali samo eden. Zanimivo je, da so se najmanjše mikoplazme tekom evolucije pojavile nekajkrat. Iz različnih filetskih linij so se razvile neodvisno ena od druge. Njihove velikosti genomov se gibljejo od 600 do 1100 kbp (Maniloff, 1996). Filogenetske gruče znotraj veje SEM so hominis, pneumonia in spiroplasma. Ti so večinoma patogeni za človeka in široko paleo živali. Predstavniki veje AAP so rastlinski patogeni (Sirand-Pugnet in sod., 2007). Debli *Acholeplasma* in *Anaeroplasma* smatrajo za najbolj zgodnji veji v *Mollicutes*, ki sta se odcepili od skupnega prednika. Rodova *Ureaplasma* in *Mycoplasma* naj bi se razvila iz rodu *Spiroplasma*. Molekula 16 S rRNA je bila pomembna za razvrstitev fitoplazem, ki jih ni bilo mogoče gojiti (Razin in sod., 1998). Mikoplazme so se najverjetneje razvile iz Gram pozitivnega prednika z visokim deležem vsebnosti baznih parov AT, npr. rodu *Clostridium*, *Bacillus* (Woese in sod., 1984). Po zadnjih podatkih so se razvile iz rodu *Streptococcus*, ki je imel genom velikosti 2 Mbp (Maniloff, 1996). Z reduktivno (ko)evolucijo so se mikoplazme prilagodile parazitskemu načinu življenja. Glede na molekulo rRNA so mikoplazme hitro razvijajoča se vrsta (Woese in sod., 1984). Posledično imajo zelo dolge veje na splošnih filogenetskih drevesih (Ciccarelli in sod., 2006). Evolucijsko neodvisne mikoplazme so dosegle velikost minimalnega genoma (600 do 800 kbp). Če se evolucijsko ne razvijajo več, pomeni, da so dosegle minimalno velikost genoma prostoživečih celic (Razin in sod., 1998).

2.1.2 Taksonomija *Mollicutes*

Na začetku razvrščanja mikoplazem je bila molekula holesterola eden izmed glavnih faktorjev klasifikacije. Slednja je tipičen primer nasprotujočih si teorij razlikovanja klasifikacij na podlagi molekularnih tehnik in fenotipskih karakteristik. Nedavne študije so pomembnost holesterola pri taksonomske razvrščanju ovrgle. Pojav potrebe po holesterolu se namreč pojavi v treh različnih filogenetskih skupinah, neodvisnih ena od druge (Razin in sod., 1998). Razdelitev *Mollicutes* v družine je torej temeljila na potrebi sterolov za rast in habitatu, velikosti genoma ter toleranci na kisik. Nadaljnje delitve na rodove so temeljile na viru in mehanizmu za pridobitev energije: glukoza, urea ali arginin (Whithford in sod., 1994).

Trenutna klasifikacija temelji na filogenetskih lastnosti ter na ostalih alternativnih markerjih. Na podlagi filogenetskih lastnosti bi se lahko izdelala nova, ustrezena klasifikacija, vendar bi lahko prišlo do problemov v diagnostiki. Trenutna veljavna klasifikacija je večfazna (Razin in sod., 1998).

Za uvrstitev bakterij v razred *Mollicutes* je potrebna določena stopnja podobnosti molekule 16 S rRNK, glede na katero so *Mollicutes* razdeljene na 5 filogenetskih enot (Razin in sod., 1998). Ostali klasifikacijski markerji so: ohranjeni geni ribosomskih proteinov, geni elongacijskih faktorjev (EF-Tu), geni proteinov hsp70 ter regije genov ITS 16 S/23 S rRNK (Razin in sod., 1998; Ludwig in Schleifer, 2005). Tudi uporaba metabolnih markerjev za razvrščanje v *Mollicutes* se je z uvedbo genetskih tehnik večinoma opustila (Razin in sod., 1998). Prav tako so na veljavnosti izgubili elektroforetski proteinski profili, ki so jih v 70-ih in 80-ih letih prejšnjega stoletja uporabljali za identifikacije vrst (Armstrong in Yu, 1970). Za določanje molekularnih lastnosti in klasifikacije *Mollicutes* so v uporabi serološke tehnike. Antigenским spremenljivostim se pri klasifikaciji in identifikaciji izognemo tako, da uporabimo specifična poliklonska protitelesa (Razin in sod., 1998). Nedavna študija primerjave taksonomije na podlagi aminokislinskega zaporedja Pgk (fosfoglicerat kinaze) in genske sekvene 16 S RNK se na nižjih taksonomskeh nivojih ujemata (Wolf in sod., 2004).

Po najnovejši klasifikaciji v deblo *Tenericutes* spada le razred *Mollicutes* (Ludwig in sod., 2011). Tako je prejšnja veljavna klasifikacija (Garrity in sod., 2004) izgubila svojo veljavo. Po zadnji veljavni klasifikaciji spadajo v razred *Mollicutes* redovi *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, in *Anaeroplasmatales*. Ta klasifikacija ni skladna s filogenijo 16 S RNK, saj vsebuje nekatere rodove, ki so redko v uporabi in vsebuje tako živalske kot človeške patogene. Glavna težava pri klasifikaciji rodu *Mycoplasma* je njen polifiletski izvor. Mikoplazme se nahajajo v 13-ih gručah znotraj *Mollicutes* v treh filogenetskih linijah (Ludwig in sod., 2011). Taksonomija *Tenericutes* je prikazana na spodnji shemi.

Preglednica 1: Sistematika debla *Tenericutes* (Ludwig in sod., 2011: 23; NCBI, 2011)

Deblo I. *Tenericutes*

Razred I. *Mollicutes*

Red I. *Mycoplasmatales*

Družina I. *Mycoplasmataceae*

Rod I. *Mycoplasma* (^a)

Rod II. *Ureaplasma* (21)

Družina II *Incertae sedis*

Rod I. *Eperythrozoon* (^b)

Rod II. *Haemobartonella* (^b)

Red II. *Entomoplasmatales*

Družina I. *Entomoplasmataceae*

Rod I. *Entomoplasma* (6)

Rod II. *Mesoplasma* (14)

Družina II. *Spiroplasmataceae*

Rod I. *Spiroplasma* (152)

Red III. *Acholeplasmatales*

Družina I. *Acholeplasmataceae*

Rod I. *Acholeplasma* (22)

Družina II. *Incertae sedis*

Rod I. “*Candidatus Phytoplasma*” (^b)

Red IV. *Anaeroplasmatales*

Družina I. *Anaeroplasmataceae*

Rod I. *Anaeroplasma* (3)

Rod II. *Asteroleplasma* (1)

Opombe: Številke v oklepajih predstavljajo število vrst. Podatki o številu so pridobljeni iz internetnega vira NCBI (2011). Število vrst se sedaj že razlikuje zaradi odkritja novih vrst.

(^a) – število vrst na NCBI (2011) je 281, vendar je ta podatek vsaj dvakrat prevelik glede na število priznanih vrst tega rodu

(^b) – sistematiki iz vira (Ludwig in sod., 2011) in NCBI (2011) se ne ujemata, zato ni podatka o številu vrst

Danes deblo *Firmicutes* ne vsebuje več razreda *Mollicutes*, ampak samo še razrede *Bacilli*, *Clostridia* in *Erysipelotrichia*. *Mollicutes* so bile odstranjene iz debla predvsem zaradi fenotipske lastnosti, da ne sintetizirajo celične stene in nekaterih ostalih markerjev, ključno vlogo je imela molekula 16 S rRNK (Wolfgang in sod., 2009). *Erysipelotrichaceae* je družina (je Gram pozitivna in sintetizira celično steno) sistematsko uvrščena v razred *Mollicutes*. Z zadnjo veljavno klasifikacijo ni bila premeščena skupaj z *Mollicutes*, bila je razvrščena v svoj razred znotraj *Firmicutes*, *Erysipelotrichia* (Wolfgang in sod., 2009). Zadnji veljavni kriteriji za razvrščevanje mikroorganizmov v razred *Mollicutes* so bili objavljeni leta 2007 (Brown in sod., 2007).

2.1.3 Genetika razreda *Mollicutes*

Genom pri *Mollicutes* vsebuje manj kot 30 % baznih parov GC (Razin in sod., 1984). Pri vrsti *M. pneumoniae* je delež nekoliko višji, okoli 40 % (Himmelreich in sod., 1996). Je dvojerižna krožna molekula DNK (Razin in sod., 1998). *Mollicutes* imajo genom velik od 600 do 2200 kbp. To predstavlja od 500 do 2000 proteinov. V posameznih skupinah se velikosti genomov razlikujejo. Tako npr. skupina pneumoniae vsebuje vrsto *M. genitalium*, ki ima najmanjši genom in *M. penetrans*, ki ima največji znan genom pri mikoplazmah (Sirand-Pugnet in sod., 2007).

Znanih je 17 sekvenciranih celotnih genomov *Mollicutes*. Od sekvenciranih genomov jih 15 spada v skupino SEM (Sirand-Pugnet in sod., 2007). Po najnovejših podatkih je teh genomov precej več. V podatkovni bazi na internetni strani NCBI je sekvenciranih že vsaj 38 različnih genomov *Mollicutes*. Nekaj sekvenciranih genomov pripada istim vrstam, vendar drugim sevom (NCBI, 2011).

Nedavne študije so ugotovile horizontalne prenose genov med vrstami *Mollicutes*. Predvsem so opazili prenose med filogenetsko oddaljenimi vrstami, ki imajo skupnega gostitelja. Npr. pri *M. gallisepticum* in *M. synoviae* so potrdili precej skupnih ortologih genov, ki imajo zapis za hipotetične in kodirajoče proteine. Kodirajoči geni imajo poleg funkcij v metabolizmu tudi funkcije vezav bakterij z gostiteljskimi celicami, so virulentni faktorji (Cizelj in sod., 2011; Berčič in sod., 2012). Ta odkritja podpirajo idejo o pomembnosti teh genov za prilagoditev na parazitski način življenja bakterij, v tem primeru na perutnino (Sirand-Pugnet in sod., 2007).

Mollicutes lahko vsebujejo tudi ekstrakromosomalne elemente. Pri rodu *Spiroplasma* so plazmidi zelo preučeni, saj jih bakterije iz tega rodu vsebujejo v velikih količinah. Študije na bakteriji *M. hominis* so pokazale krajše krožne podvojitve DNK (Razin, 1985), nadaljnje analize pa so pokazale, da gre za satelitsko DNA (Nascimento in sod., 1999). Plazmide so odkrili v *Spiroplasma citrii*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* in nekaterih fitoplazmah (Razin in sod., 1998).

2.2 BAKTERIJE RODU *Mycoplasma*

Mikoplazme so najmanjši poznani prokarionti. Velike so 0,3–0,8 µm. Prehajajo skozi pore filter in membran velikosti 450 in 300 nm (Chalker, 2005). Le majhen del mikoplazem je opisan in taksonomsko razvrščen. Najbolje preučeni sta *M. pneumoniae* in *M. genitalium*, ki sta patogeni za človeka (Razin in sod., 1998). Mikoplazme so bile prvič opisane pred 100 leti. Rod *Mycoplasma* je do nedavnega obsegal 123 vrst, katerih klasifikacija je bila opredeljena po veljavnih vrstnih kriterijih. Prav tako so bili objavljeni članki o imenovanju novih vrst (Euazeby, 2011). Danes je na podlagi genomskega analiza razvrščenih že okoli

190 vrst (Rottem, 2003), po podatkih s strani NCBI pa je teh že precej več (NCBI, 2011). Vse mikoplazme uvrščamo med *Mollicutes*, red *Mycoplasmatales*. Kar nekaj lastnosti jih ločuje od ostalih bakterij. Ne morejo sintetizirati celične stene in imajo celično membrano sestavljeno iz treh slojev (Whithford in sod., 1994). Ribosomi mikoplazem so zgrajeni iz dveh podenot: 50 S in 30 S. Vsebujejo do 50 različnih proteinov, njihova 5 S molekula rRNK je dolga 107 do 112 nukleotidov, kar je nekoliko krajše kot pri drugih evbakterijah (Razin in sod., 1984). Mikoplazme vsebujejo samo enega ali dva seta operonov rRNK (Razin in sod., 1984).

Mikoplazme so zelo občutljive na UV svetlobo, rentgenske žarke, gama žarčenje (Razin, 1985) in osmotski šok. Liza celic je odvisna od temperature, pH medija za suspendiranje, prisotnosti dvovalentnih ionov (Razin, 1964).

2.2.1 Ekologija mikoplazem

Mikoplazme so v naravi zelo razširjene. Večinoma živijo kot komenzali, paraziti, v členonožcih pa jih smatrajo za simbionte. Najdemo jih tako pri človeku, sesalcih, kuščarjih, ribah, členonožcih kot tudi pri rastlinah (Razin in sod., 1998). So različnih morfoloških oblik. Prevladuje sferična, sledita ji hruškasta in stekleničasta oblika. Mikoplazme so večinoma fakultativno anaerobni organizmi in rastejo boljše v atmosferi z manj O₂. Rodova *Anaeroplasma* in *Asteroleplasma* najdemo v vampu goveda. Sta obvezna anaeroba. *M. hyorhinis* za rast nujno potrebuje aerobno atmosfero. Enega izmed nenaravnih ekosistemov mikoplazem predstavljajo tudi celične kulture. Po različnih študijah naj bi bile celične kulture prekužene v 10–87 % (Razin in sod., 1998; Zhao in sod., 2008). Trenutno še ne obstajajo antibiotiki, ki bi uničili mikoplazme v celičnih kulturah, ampak njihovo rast le zavirajo. To pomeni, da so mikoplazme po uporabi antibiotika sicer pod mejo detekcije, ne moremo pa trditi, da jih celična linija ne vsebuje (Cooper, 2011). Za zaviranje rasti se uporabljajo makrolidni antibiotiki. Pri bakteriji *M. genitalium* so se že razvile prve mutante odporne na te antibiotike (Shimada in sod., 2011).

Pri *M. pneumoniae* in *M. mobile* so dokazali, da se lahko kemotaktično gibljejo (Razin in sod., 1998; Miyata in sod., 2002). Zanimivo je, da lahko mikoplazme v okolju preživijo nekaj dni, še posebej v okolju bogatem s proteini, vlago in hladnih okoljih. Na vzorcih jih ob nepravilnem hrانjenju prerastejo hitreje rastoče bakterije (Whithford in sod., 1994). Nekatere mikoplazme lahko tvorijo biofilm. Mednje spadajo *Mycoplasma putrefaciens*, *M. cottewii*, *M. yeatsii*, *M. agalactiae* in *M. bovis*. Biofilmi mikoplazem so veliko bolj odporni na stres, visoke temperature in izsušitve kot celice v vegetativni fazì rasti. Za določevanje strukture biofilma se uporabljajo konfokalna mikroskopija in barvanja s fluorescentnimi barvili (McAuliffe in sod., 2006).

2.2.2 Identifikacija mikoplazem

Mikoplazme so se dolgo »upirale« podrobnejšim analizam, saj jih ni bilo moč gojiti *in vitro* zaradi kompleksnih hranilnih potreb, počasne rasti in slabih izkoristkov pri gojenju ter premalo uporabnih genskih orodij (Rottem, 2003). Leta 1981 sta Rosendal in Valdivieso začela uporabljati akridin oranž za štetje mikoplazem v tekoči kulturi. To je pomagalo pri spremeljanju rasti mikoplazem in pripomoglo k večjemu izkoristku substratov pri rasti mikoplazem (Rosendal in Valdivieso, 1981). Mikoplazme na trdnem gojišču tvorijo kolonije v obliki ocvrtega jajca. Zaradi odsotnosti celične stene so neobčutljive na antibiotike, ki zavirajo rast le-te, npr. penicilin (Whithford in sod., 1994). Mikoplazme lahko barvamo po Gramu pozitivno (Thompson in sod., 2011). Večine molekularnih tehnik identifikacij se do nedavnega še ni uporabljalo rutinsko. Tudi natančnost PCR je bila slabša. Npr. 20 % pljučnih vzorcev pozitivnih na mikoplazme je bilo PCR negativnih. To dejstvo uvršča gojenje kot tehniko za pomoč pri identifikaciji mikoplazem med najbolj zanesljive (Chalker in sod., 2002). Identifikacija se vrši tudi s pomočjo kombinacije tehnik PCR in RFLP. Pomnožene regije intergenskih sekvenc 16 S DNK in 23 S DNK se obdela z dvema restriktionskima encimoma. Po elektroforezi SDS-PAGE na gelu so vzorci značilni za posamezno vrsto (Spergser in Rosengarten., 2007; McAuliffe in sod., 2005).

Najbolj uspešna metoda za določitev prisotnosti mikoplazem v celičnih linijah je RT-PCR 16 S rRNK. Občutljivost te metode je vsaj 10-krat večja od 16 S RT-PCR rDNK (znaša manj kot eden genomski ekvivalent). Čas testiranja se zmanjša z 28 na 1–2 dneva (Perepelitschouk, 2010). Glede na dejstvo, da je RNK časovno manj obstojna, lahko dobimo lažno negativne rezultate (Sykes, 2009). Za identifikacijo se uporablja tudi mikromreže cDNK (Werner, 2007) in že pripravljeni seti (Sampath in sod., 2011).

2.2.3 Taksonomija mikoplazem

V red *Mycoplasmatales* spadata dve družini in širje rodovi. V družino *Mycoplasmataceae* spadajo bakterije rodu *Mycoplasma* in *Ureaplasma*. Rod *Ureaplasma* je dobro definiran na podlagi filogenije sekvenc rRNK. V nasprotju z bakterijami rodu *Ureaplasma*, je rod *Mycoplasma* razvrščen v vsaj tri od petih evolucijsko že zgodaj odcepljenih linij (skupin) znotraj redu *Mycoplasmatales*. Vsaka skupina je razdeljena na različno število gruč. V prvo skupino spada *Mycoplasma mycoides*, tipska vrsta mikoplazem. Ta skupina je pravzaprav bolj sorodna rodu *Entomoplasma* iz reda *Entomoplasmatales*. V drugo skupino »pneumonia« spadajo bakterije rodu *Ureaplasma* in širi gruče rodu *Mycoplasma*. V tretji skupini »hominis« se nahaja preostalih osem gruč rodu *Mycoplasma*. Rodova *Eperythrozoon* in *Haemobartonella* spadata v družino *Incertae sedis*, ki večinoma vsebuje krvne parazite in rodove, ki se jih ne da gojiti. Znotraj nerazvrščenih rodu incertae sedis so mikroorganizmi razdeljeni v dve gruči (Ludwig in sod., 2011). Na več skupin jih lahko razdelimo tudi glede na gibeljivost in vrsto gostiteljev (Dybvig in Voelker, 1996).

Preglednica 2: Filogenetske skupine in gruče znotraj razreda *Mollicutes* (Ludwig in sod., 2011)

Skupina	Gruča	Pripadajoče vrste
1. skupina		
	<i>Mycoplasma mycooides</i>	<i>Mycoplasma mycooides</i> (tipska vrsta), <i>capricolum</i> , <i>cottewii</i> , <i>putrefaciens</i> in <i>yeatsii</i>
2. skupina »hominis«		
	<i>1. bovis</i>	<i>Mycoplasma adleri</i> , <i>agalactiae</i> , <i>bovigenitalium</i> , <i>bovis</i> , <i>californicum</i> , <i>caviae</i> , <i>columbinasale</i> , <i>columbinum</i> , <i>felifaicum</i> , <i>fermentans</i> , <i>gallinarum</i> , <i>iners</i> , <i>leopharyngis</i> , <i>lipofaciens</i> , <i>maculosum</i> , <i>meleagridis</i> , <i>opalescens</i> , <i>phocirhinis</i> , <i>primatum</i> , <i>simbae</i> in <i>spermatoophilum</i>
	<i>2. equigenitalium</i>	<i>Mycoplasma elephantis</i> in <i>equigenitalium</i>
	<i>3. hominis</i>	<i>Mycoplasma alkalescens</i> , <i>anseris</i> , <i>arginini</i> , <i>arthritidis</i> , <i>auris</i> , <i>buccale</i> , <i>canadense</i> , <i>cloacale</i> , <i>equirhinis</i> , <i>falconis</i> , <i>faucium</i> , <i>gateae</i> , <i>gypis</i> , <i>hominis</i> , <i>hyosynoviae</i> , <i>indiense</i> , <i>orale</i> , <i>phocicerebrale</i> , <i>phocidae</i> , <i>salivarium</i> , <i>spumans</i> in <i>subdolum</i>
	<i>4. lipophilum</i>	<i>Mycoplasma hyopharyngis</i> in <i>lipophilum</i>
	<i>5. neurolyticum</i>	<i>Mycoplasma bovoculi</i> , <i>collis</i> , <i>cricetuli</i> , <i>conjunctivae</i> , <i>dispar</i> , <i>flocculare</i> , <i>hyopneumoniae</i> , <i>hyorhinis</i> , <i>iguanae</i> , <i>lagogenitalium</i> , <i>molare</i> , <i>neurolyticum</i> in <i>ovipneumoniae</i>
	<i>6. pulmonis</i>	<i>Mycoplasma agassizii</i> , <i>pulmonis</i> in <i>testudineum</i>
	<i>7. sualvi</i>	<i>Mycoplasma moatsii</i> , <i>mobile</i> in <i>sualvi</i>
	<i>8. synoviae</i>	<i>Mycoplasma alligatoris</i> , <i>anatis</i> , <i>bovirhinis</i> , <i>buteonis</i> , <i>canis</i> , <i>citelli</i> , <i>columborale</i> , <i>corogypsi</i> , <i>crocodyli</i> , <i>cynos</i> , <i>edwardii</i> , <i>felis</i> , <i>gallinaceum</i> , <i>gallopavonis</i> , <i>glycophilum</i> , <i>leonicaptivi</i> , <i>mustelae</i> , <i>oxoniensis</i> , <i>pullorum</i> , <i>sturni</i> , <i>synoviae</i> in <i>vereendum</i>
3. skupina »pneumoniae«		
	<i>1. fastidiosum</i>	<i>Mycoplasma cavipharyngis</i> in <i>fastidiosum</i>
	<i>2. hemotropic</i>	<i>Mycoplasma coccoides</i> , <i>haemocanis</i> , <i>haemofelis</i> , <i>haemomuris</i> , <i>ovis</i> , <i>suis</i> in <i>wenyonii</i> *
	<i>3. muris</i>	<i>Mycoplasma iowae</i> , <i>microti</i> , <i>muris</i> in <i>penetrans</i>
	<i>4. pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma alvi</i> , <i>amphoriforme</i> , <i>gallisepticum</i> , <i>genitalium</i> , <i>imitans</i> , <i>pirum</i> , <i>pneumoniae</i> in <i>testudinis</i>
	<i>Ureaplasma</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (tipska vrsta), <i>canigenitalium</i> , <i>cati</i> , <i>diversum</i> , <i>felinum</i> , <i>gallorale</i> in <i>parvum</i>
4. skupina <i>incertae sedis</i>		
	<i>1. gruča</i>	<i>Eperythrozoon coccoides</i> (tipska vrsta) ter <i>Haemobartonella canis</i> in <i>felis</i>
	<i>2. gruča</i>	<i>Eperythrozoon ovis</i> , <i>suis</i> in <i>wenyonii</i> .

*nekaj vrst je bilo prerazporejenih v skupino hemotropic iz družine *incertae sedis* (*Mycoplasmatales*) iz rodov *Eperythrozoon* in *Haemobartonella*

V obravnavi je taksonomija mikoplazem na podlagi analiz celotnih genomov mikoplazem (Thompson in sod., 2011). Projekt je zelo obsežen in še nekaj časa ne bo zaključen.

2.2.4 Metabolizem mikoplazem

Mollicutes imajo zaradi majhnega genoma zelo omejen metabolizem, ker se je evolucija odvijala v smeri izgub genetskega materiala. Tako sta osiromašena katabolizem in anabolizem. Katabolizem je v glavnem usmerjen v produkcijo energije. Energetske poti *Mollicutes* proizvedejo nizke koncentracije ATP in visoke koncentracije končnih produktov. Zaradi tega pride do izčrpanja substrat-a/ov iz gostiteljskih tkiv. Anabolizem je odvisen od okolja, tj. zunajceličnih koncentracij lipidov, aminokislin, nukleinskih kislin in ostalih molekul (Miles, 1992).

Nekatere mikoplazme rastejo zelo počasi celo v najboljših medijih, ki so danes na voljo. Precej mikoplazem še ne moremo gojiti, saj ne znamo ustvariti pravih gojitvenih pogojev. Glede na dejstvo, da mikoplazme za rast potrebujejo veliko različnih snovi, rast pogosto zavira vsebnost posamezne oz. posameznih toksičnih komponent v kompleksnih gojiščih (Razin in sod., 1998). Pojavila se je nova metoda *in vitro* gojenja mikoplazem, t. i. vzporedno gojenje z evkariontskimi celičnimi linijami. Na ta način so uspeli gojiti nekatere rastlinske mikoplazme, ki *in vitro* še niso bile gojene (Sirand-Pugnet in sod., 2007). Prav tako so uspeli povečati produkcijo nekaterih mikoplazem patogenih za človeka, *M. pneumoniae*, ki je pomembna za raziskave v medicini (Razin in sod., 1998). Mikoplazme potrebujejo za rast tudi vir streolov in maščobnih kislin, zato jim dodajajo živalski serum. Energijske potrebe mikoplazem so si podobne. Preko glikolize večinoma razgrajujejo glukozo oz. druge razgradljive saharide. Nekatere razgrajujejo tudi arginin in aktiviran acetat. Ureaplazme hidrolizirajo ureo. Vse te poti pridobivanja energije potekajo anaerobno. Mikoplazme nimajo respiratornega sistema, ki bi neposredno porabljaj kisik. Kisik jim ne škodi in ne koristi. Uporaba posameznega vira omenjenih snovi za pridobivanje energije nam pomaga tudi pri razvrščanju (Whithford in sod., 1994). Mikoplazme nimajo cikla citronske kisline. Nimajo citokromov in kinonov, kar izključuje oksidativno fosforilacijo kot vir ATP. Kot že omenjeno proizvajajo nizke koncentracije ATP in visoke koncentracije končnih produktov, kar se pokaže kot izčrpanost posameznih komponent iz gojišč ali gostiteljskih tkiv (Razin in sod., 1998). Mikoplazme lahko delimo v fermentativne in nefermentativne. Fermentativne mikoplazme pretvarjajo glukozo po poti glikolize EMP do kisline, kar privede do padca pH v gojišču (Himmelreich, 1996). Nefermentativne mikoplazme pretvarjajo arginin po arginin dehidrolazni metabolni poti, kjer pride do povišanja pH v gojišču (Razin, 1978).

2.2.5 Membrana mikoplazem

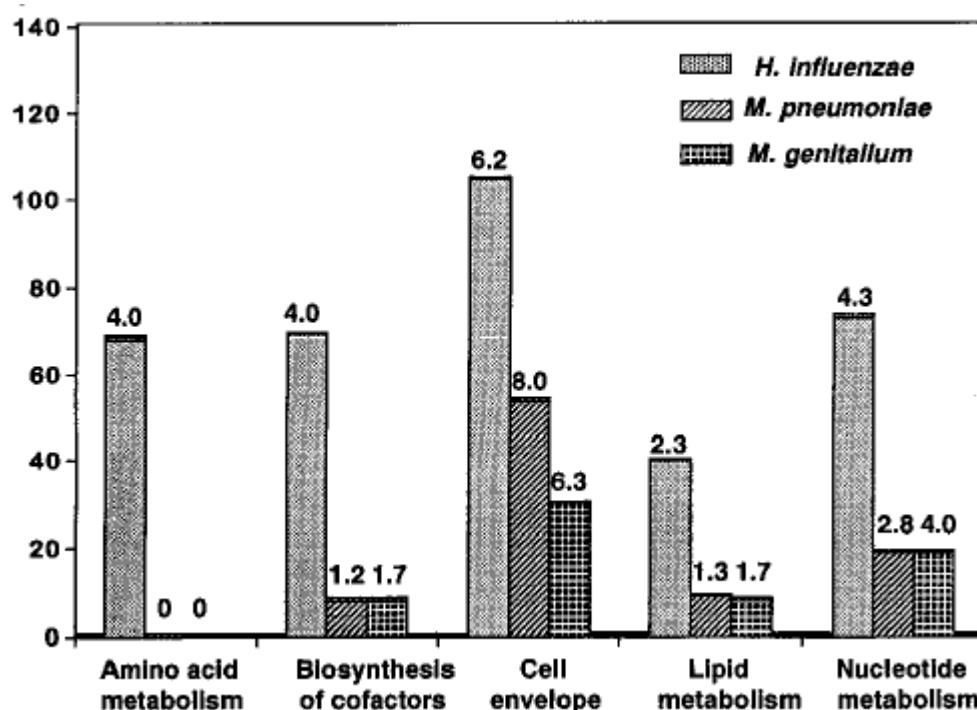
Mikoplazme so od okolja omejene samo s celično membrano, nimajo pa celične stene. Dve tretjini mase membran predstavljajo proteini, preostalo tretjino lipidi. Membrane mikoplazem vsebujejo v primerjavi z evbakterijami velike količine lipoproteinov. Slednji so pri razredu *Mollicutes* prevladujoči antigeni in so podvrženi antigenskim spremembam

in spremembam v molekulski masi. Membranski lipidi so po sestavi fosfolipidi, glikolipidi in nevtralni lipidi. Mikoplazme so v celoti ali delno nesposobne biosinteze maščobnih kislin in so popolnoma odvisne od maščobnih kislin gostitelja ali gojitvenega medija. Zaradi te lastnosti se mikoplazme uporablja kot modele za preučevanja membran. Sestavo membran mikoplazem lahko do neke mere nadzorujemo s prisotnostjo različnih lipidov in streolov v gojiščih. Največ študij o fizikalnih lastnostih membran je bilo izvedenih na vrsti *A. laidlawii*. *A. laidlawii* s pomočjo spreminjanja strukture polarnih glav in acilnih skupin premosti različne mikro-okoljske in fiziološke razmere. Druge evbakterije regulirajo osmotske razlike s kontroliranjem stopnje nasičenosti acilnega dela maščobnih kislin (Razin in sod., 1998).

Membrane mikoplazem se lahko spajajo z drugimi membranami. V prvi vrsti k spoju s celico gostitelja prispevajo različni proteini. Obdelava mikoplazem s proteazami popolnoma zavre fuzijo mikoplazem (Tarshis in sod., 1991). Zadnje raziskave velik del sposobnosti zlivanja membran pripisujejo prisotnosti molekul holesterola (Citovsky in sod., 1988) in unikatnih molekul glikoglicerolipida, ki so prisotne v membrani *M. fermentas* (Deutsch in sod., 1995).

2.2.6 Genetski zapisi rodu *Mycoplasma*

V povprečju imajo mikoplazme genom velik okoli 1 Mbp. Velikost genoma mikoplazem obsega od 580 kbp (*Mycoplasma genitalium*) do 1358 Mbp (*Mycoplasma penetrans*) (Miyata in Seto, 1999). Velikosti genomov so različne tudi znotraj posamezne vrste in so posledica velike količine kratkih ponovljenih zaporedij DNK (Razin in sod., 1998). Ker imajo najmanjši genom, služijo kot matrice za sestavljanje sintetičnih živih organizmov (Pennisi, 2010). Genomi pri mikoplazmah vsebujejo od 24 do 40 % GC baznih parov. Porazdelitev GC baznih parov je vzdolž genoma različna. Kodirajoče in ohranjene regije imajo navadno višje vsebnosti GC baznih parov, nekodirajoče regije pa vsebujejo tudi od 80 do 90 % AT baznih parov. Mikoplazme imajo zelo malo odprtih bralnih okvirjev (ORF). *M. genitalium* jih ima 479, *M. pneumoniae* 677. V primerjavi z drugimi bakterijami je to zelo malo, npr. *H. influenzae* jih ima 1703 ter *E. coli* (sev K-12) 4288 (Razin in sod., 1998). Največji osip genov (slika 1) se je skozi evolucijo zgodil zaradi izgube genov za sintezo celične stene, aminokislin in kofaktorjev. Številke nad stolpcem na sliki 1 označujejo delež vseh odkritih genov pri posamezni vrsti (Razin in sod., 1998).



Slika 1: Primerjava števila genov bakterij *H. influenzae*, *M. pneumoniae*, in *M. genitalium* (Razin in sod., 1998).

Mikoplazme imajo tudi nekaj genov za popravljanje DNK. Število molekul tRNK je prav tako manjše v primerjavi z ostalimi bakterijami. Mikoplazme, ki imajo raziskano število genov tRNK, vsebujejo v povprečju 30 genov tRNK. Manj jih imajo le mitohondriji pri kvasovkah. Teoretični minimum je 23 tRNK. Zaradi nizke vsebnosti GC baznih parov, je tudi vsebnost tRNK s podobnimi antikodoni nizka, kar posledično pomeni, da mikoplazemski proteini vsebujejo manj določenih aminokislin (Gly, Pro, Ala in Arg). Kodon UGA pri večini prokariontov predstavlja STOP kodon. Pri mikoplazmah UGA kodira zapis za triptofan. Glede na to, da mikoplazme nimajo celične stene, bi lahko bil genetski transfer večji kot normalno, vendar to ne drži. Transfer se nekoliko poveča z uporabo polietilenglikola in elektroporacije, medtem ko transformacija z liposomi ne doseže želenih učinkov. Študije genetskih prenosov so omejene zaradi omejene količine selektivnih markerjev, uporablja se večinoma tetraciklinska rezistenza. Zaradi velikega števila horizontalnih prenosov DNK so mikoplazme znotraj vrst mikoplazem zelo heterogene (Razin in sod., 1998).

Prvi virus patogen za mikoplazme je bil odkrit leta 1970. Virusi mikoplazem niso podobni klasičnim bakteriofagom. Tipični bakteriofagi imajo izrastke, ki so pomembni za vnos DNK v gostitelja, poleg tega imajo funkcijo pritrjevanja. Filamentozni in ikozaedrični virusi mikoplazem pa so edinstveni. So zelo enostavne oblike in nimajo prirastkov ter organizirane notranje strukture. Bolj kot bakterijskim so podobni živalskim virusom,

predvsem pri njihovem sproščanju iz celic. Pri mikoplazmah ne pride do lize celic, ampak se virusi sproščajo kontinuirno (Razin, 1985).

2.2.7 Razmnoževanje mikoplazem

Celični cikel se pri mikoplazmah začne s podvajanjem DNK. DNK se začne podvajati blizu mesta dnaA v obe smeri. V eno smer se sinteza začasno ustavi. Podvojevalna hitrost je zelo počasna in enakomerna. Podvojena DNA potuje proti poloma do nekje $\frac{1}{4}$ in $\frac{3}{4}$ dolžine celice, nakar sledi celična delitev. Delitev temelji na cepitvi na dva enaka dela. V primeru zaviranja podvojevanja DNA, se tvori razvezjana oblika celice. Celice mikoplazem lahko v osnovi delimo na dve vrsti: prva je s tipično polarno ureditvijo in druga z razvezjano nepravilno obliko. Polarne oblike mikoplazem imajo terminalni organel za pritrjanje, ki hkrati pomaga tudi pri drsenju, premikanju mikoplazem. Zadnje študije združujejo ta organel tudi s celično delitvijo. Poleg prvotnega originalnega organela se namreč sestavi še eden, ki pred celično delitvijo potuje na sosednji pol. Prav tako so pri *M. pneumoniae* s pomočjo detergentov in elektronske mikroskopije odkrili fibrile podobne F-aktinu (Miyata in Seto, 1999).

2.2.8 Patogeneza mikoplazem

Mikoplazme so evolucijsko gledano blizu idealnega parazita, saj večina ne povzroča akutnih bolezni, kar je znak dolgotrajne koevolucije. Povzročajo veliko število bolezni kronične narave (Razin in sod., 1998). Mikoplazme so površinski patogeni mikroorganizmi sluznic (Razin in Jacobs, 1992). V zadnjem času se je pri precej boleznih z neznanimi vzroki za nastanek oz. neznanim povzročiteljem ugotovila povezava z mikoplazmami. Te bolezni so npr.: AIDS, sindrom Zalivske vojne (GWS), sindrom kronične utrujenosti, Kronova bolezen in različne vrste artritisov. Klinične slike okužb z mikoplazmami kažejo, da so poškodbe v tkivih obolelega posledica delovanja lastnega imunskega sistema in ne toksičnih produktov mikoplazem. Potencialnih toksinov pri mikoplazmah še niso odkrili. Delno toksični so stranski produkti, kot so npr.: vodikov peroksid, superoksidni radikali in amoniak, ki povzročajo škodo okoliškemu tkivu (Razin in sod., 1998).

Za kolonizacijo in virulenco mikoplazem je potrebna pritrditev na gostitelja. Nimajo tipičnih fimbrij, zato je njihova sposobnost pritrjanja povezana z membranskimi proteini. Glavna proteina za pritrjanje pri *M. genitalium* in *M. pneumoniae* sta P1 in MgPa. (Razin in Jacobs, 1992). Mikoplazme večinoma nimajo sposobnosti vdiranja v celice (Minion in sod., 1993) razen *M. penetrans*. Premorejo izjemno fenotipsko plastičnost (Rottem, 2003). Razvile so različne mehanizme izmikanja odzivu imunskega sistema, prenosa in kolonizacije novega gostitelja. Ti mehanizmi vključujejo molekularno mimikrijo, preživetje znotraj fagocitnih in nefagocitnih celic. Nekatere patogene mikoplazme so gostiteljsko specifične. Določene lahko v nekaterih gostiteljih povzročijo bolezen v drugih

ne. Pri prizadetih živalih je večkrat prisotnih več vrst mikoplazem. Pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom pride tudi do sistemskega razširjanja bakterij (Whithford in sod., 1994). Bolezni, ki jih povzročajo mikoplazme, so poleg že omenjenih netipične pljučnice, okužbe genito-urinarnega trakta, encefalitis (Tong in sod., 2011), artritisi pri ljudeh (Haijer in sod., 1999) in živalih (Razin in sod., 1998).

Potencialni virulentni dejavniki so proteaze in nevraminidaze. Nevraminidaze omogočajo bakterijam *M. cynos* in *M. canis* vezavo na celice epitelija in kolonizacijo (May in Brown, 2009). *M. gallisepticum* in *M. synoviae* z nevraminidazami povzročata veliko ekonomsko škodo v reji perutnine. Vrsti imata na površini tudi hemaglutinin, ki preko receptorjev za sialično kislino pritrdi patogeni vrsti na celice epitela gostitelja (Berčič, 2009). Da ugotovimo ali ima določena vrsta nevraminidaze, je potrebno testirati več sevov vrste (May in Brown, 2009). *M. gallisepticum* in verjetno tudi *M. synoviae* posedujeta gen za cisteinsko proteazo (CysP) molekulske mase 67 kDa. Ta razreže kokošje IgG na fragmente Fab in Fc in je tako pomemben faktor preživitvene strategije, kljub imunskemu odgovoru gostitelja (Cizelj in sod., 2011). Mikoplazme izločajo veliko vrst nukleaz in ribonukleaz, ki so zelo različne (Minion in sod., 1993). Te nukleaze naj bi bile odgovorne za klastogenske učinke mikoplazem (lomljenje kromosomov v celicah gostitelja) (Razin in sod., 1998).

Spolšni molekularni mehanizmi patogenosti mikoplazem ostajajo nerazrešeni, kljub temu da je že kar nekaj opisanih virulentnih faktorjev (Razin in sod., 1998).

2.2.9 Antagenska spremenljivost mikoplazem

Mikroorganizmi za svoj obstoj potrebujejo mehanizme za zaznavanje okolja, da se prilagodijo spremembam le-tega. To še posebej velja za patogene mikroorganizme, ki so izpostavljeni obrambnim mehanizmom imunskega sistema. Fenotipska plastičnost je definirana kot sposobnost enega genotipa bakterij, da prevzema eno ali več morfoloških oblik, fizioloških stanj in/ali obnašanj glede na spremenjajoče se okoljske pogoje. Ena izmed glavnih lastnosti fenotipske plastičnosti je antigenska spremenljivost ali fenotipsko preklapljanje. Najpomembnejša je antigenska spremenljivost površinskih struktur, kot so bički, pili, površinski in zunajcelični proteini ter kapsule. Ti so primarna tarča odziva imunskega sistema gostitelja. Imunski sistem tako ne prepozna hitro spremenjajočih se antigenov. Za aktiviranje antigenske spremenljivosti sta možni dve poti. Prva je prenos signalov iz gostiteljskega okolja, druga je spontano generiranje populacij celic z drugim antigenskim fenotipom. To dosežejo bakterije s pomočjo mutacij, katerih frekvenca je višja od normalne (10^{-4} do 10^{-2} ; normalna frekvenca mutacije pri bakterijah je 10^{-8}).

Glede na majhen genom mikoplazem in izpostavljenost membrane okolju bi lahko predvidevali, da mikoplazmam primanjkuje oz. imajo malo prilagoditvenih in patogenih sposobnosti, sploh v okolju aktivnega odziva imunskega sistema. Imajo minimalno število

šaperonskih genov, ki sodelujejo pri zvijanju proteinov. Genomske primerjave *M. genitalium*, *M. pneumoniae* in *Haemophilus influenzae* dokazujejo ravno nasprotno. Genov, ki sodelujejo pri preklapljanju antigenskih fenotipov, je pri mikoplazmah z majhnim genomom zelo veliko. Pri *M. galisepticum* (sev R) ti geni predstavljajo kar 16 % celotnega genoma. V nekem trenutku se v določenem sevu od celotnega nabora genov za fazno spremenljivost izraža samo eden. Glavna strategija preživetja mikoplazem temelji na naključnih mutacijah, ki generirajo visoko frekvenco antigenskih mutant z različnim fenotipom. Genetski mehanizmi, ki omogočajo fazno spremenljivost mikoplazem, so razdeljeni v tri skupine. Prva je fazna sprememba kratkih homopolimernih zaporedij. Ta zaporedja služijo kot »hot spots« za vnos in izbris nukleotidov med podvajanjem DNK. Druga možnost je fazna spremenljivost preko kromosomskih preureditev. Tu gre za inverzije DNK, genske konverzije, podvojitve, izbris tandemskih homolognih podvojitev DNK in premikanje transpozonskih elementov (Razin in sod., 1998). Primer take inverzije je gen *vlhA* bakterije *Mycoplasma synoviae*, ki določa proteine za hemaglutinin. Gen *vlhA* ima en celoten gen in več pseudogenov. Celoten gen ima na 5' koncu ohranljeno regijo s promotorskim delom. Prihaja do rekombinacij z različnimi pseudogeni, ki pa so zapisi za 3' konec teh proteinov (Noormohammadi in sod., 2000; Slavec in sod., 2011; Benčina, 2002). Do sedaj je znanih okoli 70 pseudogenov *vlhA* (Benčina, 2012). Tretja možnost predstavlja velikostno spremembo domen, ki se v posameznih proteinih nahajajo v večjem številu. V zadnjem času se povečuje število na novo odkritih površinskih antigenov s tandemsko ponovljenimi domenami. Slednja ponovitvena zaporedja so tarča mutacij (Razin in sod., 1998). Veliko napak pri prevajanju sekvenc DNK v proteine naredijo aminoaciltransferaze, ki na tRNA pripnejo neustrezno, a po strukturi podobno aminokislino (Li in sod., 2011).

2.3 MIKOPLAZME, IZOLIRANE IZ PSOV

Pojem mikoplazme, izolirane iz psov, ali v direktnem prevodu »pasje mikoplazme«, ni pojem, ki bi bil zelo dobro opredeljen. Rosendal je leta 1975 predlagal ta termin, vendar se ni uveljavil le za mikoplazme, ki so jih izolirali samo iz psov, ampak tudi iz drugih organizmov. Torej vse pasje mikoplazme niso gostiteljsko specifične. V večini primerov mikoplazme predstavljajo normalno bakterijsko floro pri psih, dokler se ne pojavijo ustrezni pogoji oz. ustrezni mikroorganiz-em/mi, ki sprožijo bolezensko stanje. Najdemo jih na mukoznih membranah in v zgornjem delu respiratornega trakta. Lahko so tudi primarno patogeni mikroorganizmi. Naselijo se tako na migetalčnem epitelu kot tudi na delih respiratornega trakta, ki ni obdan z migetalkami. *M. cynos* je kot kaže primarno patogena bakterija in povzroča okužbe spodnjega respiratornega trakta pri psih (Chalker, 2005). *M. canis* je pasja mikoplazma izolirana iz respiratornega in urinarnega trakta in reproduktivnih delov psov. Izjemoma lahko povzroči atipično pljučnico pri človeku ali teletih (May in Brown, 2009).

Na področju mikoplazem pri psih je bilo v zadnjih 40 letih objavljenih nekaj več kot 50 člankov. Prvo odkritje mikoplazem pri psih sega v leto 1934 (Shoetensack, 1934). Do danes so odkrili veliko novih vrst in naredili povezave z nekaterimi boleznimi. Mikoplazme pri psih so: *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma canis*, *Mycoplasma cynos*, *Mycoplasma edwardii*, *Mycoplasma feliminutum*, *Mycoplasma felis*, *Mycoplasma gateae*, *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma maculosum*, *Mycoplasma molare*, *Mycoplasma opalescens*, *Mycoplasma* sp. HRC689, *Mycoplasma* sp. VJC358, *Mycoplasma spumans* in *Ureaplasma canigenitalium* (Chalker, 2005). Lansko leto je bila odkrita nova vrsta *Mycoplasma mucosicanis* (Spergser in sod., 2011). Prvič so psi izpostavljeni mikoplazmam ob skotitvi, ko prehajajo skozi porodni kanal (Eberle in Kirchhoff, 1976). Mikoplazme pri psih povzročajo anemijo (*M. haemocanis*, *M. haemofelis*, 'Candidatus *M. haemominutum*', 'Candidatus *M. turicensis*' in 'Candidatus *M. haematoparvum*'), respiratorne težave (*M. cynos*), okužbe urogenitalnega trakta (*M. canis*), neplodnost (*M. canis*) (Chalker, 2005), lahko pa tudi kolitis in endokarditis (Whithford in sod., 1994), vnetje mlečnih žlez in mandljev (Lein, 1986). *M. cynos* pri mladih psičkih povzroča bronhialno pljučnico in akutno vnetje pleuralne membrane. Pasja samica prenese bakterije oralno na mladičke. Za zdravljenje mikoplazem se uporabljo makrolidni antibiotiki. V primeru negativnih rezultatov standardnih bakterioloških preiskav, je pri psih verjetnost okužbe z *M. cynos* večja. Kot učinkovito zdravilo se uporablja eritromicin (Zeugswetter in sod., 2007).

2.3.1 Izolacija in identifikacija

Večina mikoplazem, izoliranih iz psov, raste hitro na mediju B. Ta je včasih vseboval kunčji bujon s 15 % kunčjim serumom, 10 % kvasnim ekstraktom 0,002 % DNK, talijev acetat (1:1000) in penicilin (1,000 i.u./ml) (Rosendal in Black, 1972). Danes se kunčjega seruma za gojišča ne uporablja več (Benčina, 2012). Mikoplazme rastejo tudi na medijih, ki so dostopni v prosti prodaji (*Mycoplasma* solid medium, *Mycoplasma* Experience Ltd, Reigate, Surrey, UK). Rastejo aerobno pri 37 °C, anaerobno ali celo na krvnem agarju. Gojenje je še vedno najbolj pogosta metoda za določanje mikoplazem izoliranih iz psov. Izkušeni raziskovalec nekaj dni staro kolonijo opazi s prostim očesom, vendar je za potrditev kolonij v obliki ovrtega jajca potreben mikroskopski pregled. Morfologija kolonij nam pri določevanju vrst ni v pomoč. Večina kolonij v obliki ovrtega jajca je različnih zrnastih struktur in različno obsenčena, vendar samo na podlagi teh informacij ne moremo zagotovo identificirati vrst. Mešane okužbe z različnimi mikoplazmami so zelo pogoste. Mikoplazme lahko tipiziramo tudi z biokemijskim profilom, vendar je metoda zamudna in draga. Biokemijski testi lahko posamezen sev mikoplazme samo razvrstijo v posamezno skupino, ne omogočajo pa identifikacije. Za identifikacijo uporabljajo specifične antiserume in imunofluoresenco ali encimsko imunske teste. Nekatere mikoplazme na krvnem agarju povzročajo hemolizo (Chalker, 2005).

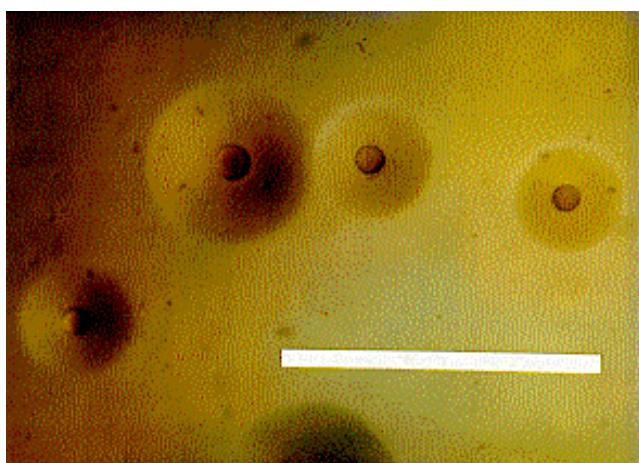
2.3.2 Taksonomija mikoplazem izoliranih iz psov

Nekaj vrst je bilo tekom zgodovine napačno razvrščenih med pasje mikoplazme, npr. vrsta *M. collis*. Pri dokazovanju pasjih mikoplazem so nam v pomoč serološki testi, vendar specifična protitelesa še niso pripravljena za splošno rabo. V pomoč so nam tudi različni gojitveni pogoji. Diagnostika mikoplazem je odvisna od nekaj specializiranih laboratorijskih. Od vseh mikoplazem izoliranih iz psov, jih kar nekaj najdemo tudi pri drugih živalih, npr. kozah, ovcah, mačkah, govedu, konjih in celo pri ljudeh. Na podlagi zaporedij 16 S rRNK so si *M. cynos*, *M. canis*, *M. felis* in *M. edwardii* taksonomsko zelo podobne. Določili so jim IGS (intergenic sequence), medgenska zaporedja med genoma 16 S rRNK in 23 S rRNK. Ta sekvenca je pomagala uvrstiti mikoplazme izolirane iz psov med ostale mikoplazme. Vse mikoplazme izolirane iz psov, razen *M. feliminutum* in *M. haemocanis*, spadajo v skupino hominis (Chalker in Brownlie, 2004).

2.4 VRSTA *Mycoplasma cynos*

Ime izvira iz grške besede »cyon«, pes; »cynos«, iz psa, pasji. Tipski sev bakterije H 831 hranijo v ZDA pod številko ATCC27544, v Veliki Britaniji pod številko NCTC 10142. Štiri dni stare kolonije so pod mikroskopom vidne v obliki ocvrtega jajca s sredinskim zvišanim delom (*M. cynos*, 2011). Na sliki 2 je dolžina bele merilne oznake 1 mm. Rast bakterij v tekočih kulturah je vidna po dveh dneh. Prisotni so tudi skupki celic. Elektronska mikroskopija kaže na pleomorfnost bakterije. Bakterije ne rastejo na gojišču brez serumata in na gojišču, ki vsebuje samo palmitinsko kislino. Rastejo na gojiščih s holesterolom. Biokemijske karakteristike *M. cynos* so opisane v preglednici 3. Iz preglednice je razvidna tudi primerjava *M. cynos* z biokemijskimi lastnostmi nekaterih drugih mikoplazem izoliranih iz psov (Rosendal, 1973). V preglednico je dodan tudi stolpec, ki opisuje hemaglutinacijske lastnosti nekaterih vrst (Benčina, 2012).

M. cynos prehaja skozi filtre s porami 450 nm in 200 nm. Tudi elektroforetski profil proteinov se razlikuje v primerjavi z drugimi mikoplazmami izoliranimi iz psov (Rosendal, 1973).



Slika 2: *Mycoplasma cynos*, sev NC 10142 (Windsor in Windsor, 2007).

Preglednica 3: Biokemijske karakteristike *M. cynos* v primerjavi z nekaterimi drugimi sevi mikoplazem izoliranih iz psov (Rosendal, 1973: 52)

Sev	Fermentacija glukoze	Hidroliza arginina	Sinteza fosfataz	Redukcija tetrazolijevih soli (aerobno/anaerobno)	Hemoliza eritrocito v morskega prašička	Hemoliza	Hemagluti-nacija oz. hemadsorp-cija
<i>M. spumans</i> PG 13	-	+	+	-/-	-	ND	ND
<i>M. canis</i> PG14	+	-	-	-/+	+	+(-)	+(-)
<i>M. maculosum</i> PG15	-	+	+	-/+	-	ND	ND
<i>M. edvardii</i> PG24	+	-	-	-/+	+	ND	ND
<i>M. cynos</i> H831	+	-	+	-/+	+	+	+(-)

M. cynos je bila do zdaj pri psih izolirana poleg respiratornega trakta (Chalker, 2005; Sunhwa in Okjin, 2012) in še iz očesne veznice, prostate, urinarnega trakta, vagine in prepucija (Chalker, 2005). *M. cynos* so dokazali tudi pri obolelih mačkah z okužbo očesne veznice (Hartmann in sod., 2010). Patogene bakterije *M. cynos*, izolirane v različnih državah, so si med seboj genetsko zelo podobne, kar nakazuje na stabilnost genoma te vrste (Mannering in sod., 2009).

2.4.1 Obolenja pri psih povezana z *Mycoplasmo cynos*

Vsi psi imajo mikoplazme v zgornjem delu dihal, kjer tvorijo normalno bakterijsko floro. Samo 20–25 % zdravih psov ima mikoplazme v trahejah. V pljučih so mikoplazme prisotne pri pljučnici ali pri psih mlajših od enega leta s pljučnimi boleznimi. Pri okužbah z *Bordetella* in *Streptococcus* v nižjih delih dihal je verjetnost okužb z mikoplazmami večja. Prisotnost mikoplazem je povezana s septičnimi vnetji (Chalker, 2005).

Še vedno ni jasna vloga mikoplazem kot primarnih ali sekundarnih povzročiteljev pri pljučnih bolezni psov, čeprav so bile izolirane v čistih kulturah. Obstaja možnost, da se izvor za kolonizacijo pljuč nahaja v žrelu, povod za bolezen pa je lahko imunska oslabelost psa ali morebitna prisotnost druge okužbe. *M. cynos* je edina mikoplazma, ki je zelo pogosto povezana z respiratorno boleznijo pri psih. Z vbrizganjem *M. cynos* v bronhije psov so umetno povzročili bolezenske znake. Pojavili so se znaki pljučnice, propad in izguba cilij (Chalker, 2005). Nedavno so ugotovili povezavo med *M. cynos* in nalezljivo pasjo respiratorno boleznijo. Pri psih, mlajših od enega leta, je verjetnost okužbe večja kot pri psih, starejših od enega leta. Pri psih, ki so bili na novo sprejeti v zavetišče in so zboleli, so v 20 % primerov odkrili *M. cynos* v spodnjem delu pljuč. Število obolelih psov se je po štirih tednih zmanjšalo, kar pomeni, da se je razvil učinkovit odgovor imunskega sistema (Chalker, 2005).

Že Rosendal je dokazal povezavo med *M. cynos* in pasjo kugo. Pri štirih pasjih mladičkih so se po inokulaciji pokazali znaki bolezni. Vsi znaki okužbe so bili popolnoma enaki kot pri okužbi podgane z *Mycoplasmo pulmonis* (Rosendal, 1978). Podobno lahko *Mycoplasma agassizii* povzroči bolezen respiratornega trakta pri želvah (Schumacher in sod., 1993). *M. cynos* se tekom bolezni iz sistema odstrani med četrtnim in petim tednom okužbe. Takrat se tudi znatno dvigne titer protiteles proti *M. cynos*. V tem času iz pljučnega tkiva niso več izolirali in dokazali *M. cynos* z metodo gojenja na gojišču (Rosendal, 1978). *M. cynos* (sev 896) je pri mladičkih zlatega prinašalca povzročil hujšo obliko pljučnice (Zeugswetter in sod., 2007).

CIRD (canine infectious respiratory disease) je nalezljiva dihalna bolezen psov imenovana zavetiščni kašelj ali tudi infekcijski traheobronhitis. Največkrat povzroči škodo ugledu pasjega azila ali zavetišča (Lynn, 1986). Gre za okužbo pri kateri lahko sodeluje do devet znanih mikroorganizmov: *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus*, več vrst mikoplazem in več vrst virusov. Sama okužba deluje vzajemno; npr. virus kuge je citolitičen, *Bordetella* slabí fagocite in tako okužba napreduje hitreje kot če bi šlo za okužbo posameznega mikroorganizma. Čeprav so se molekularne tehnike za določevanje mikoplazem izboljšale, je včasih vseeno težko povezati pozitiven rezultat z boleznijo, ravno zaradi prisotnosti mikoplazem v zgornjih dihalih psov (naravna mikroflora) (Sykes, 2009; Brownlie in sod., 2007; Chalker in sod., 2003). *M. cynos* je

edina mikoplazma povezana s CIRD. Prisotnost *M. cynos* pri psih je povezana z daljšim časom v zavetišču, starostjo psičkov (dovzetnejši so psički mlajši od enega leta) in poznimi fazami bolezni CIRD (Chalker in sod., 2004; Mannering in sod., 2009; Chvala in sod., 2007). Pse lahko proti CIRD cepimo. Cepivo deluje proti patogenim virusom, ki so le en del patogenih mikroorganizmov prisotnih pri okužbi (Brownlie in sod., 2007). Simptomi blage oblike CIRD so kašljanje, bruhanje, anoreksija in depresija. V resnejših primerih pride do traheobronhitisa, pljučnice in smrti. Pri CIRD so na podlagi vzorcev 42 psov odkrili serumska protitelesa proti antigenu *M. cynos* z molekulsko maso približno 45 kDa (Rycroft in sod., 2007). Pri *M. cynos* so identificirali nevraminidazo molekulske mase 105 kDa (Berčič in sod., 2011).

V okoljih, kjer je gostota psov večja (zavetiščih, dnevnih pasijh centrih in psarnah), je potrebno uvesti postopke za preventivno preprečevanje širjenja bolezni. Med te postopke spadajo zračenje, zmanjšanje gostote populacije psov in visoka stopnja higiene (Zakon o zaščiti..., 2007).

2.5 IMUNOGENE MOLEKULE BAKTERIJ

Proteini, ki vsebujejo prolinsko bogata zaporedja, so znani imunogeni proteini nekaterih prokarionskih in evkarionskih patogenov. Večina teh aminokislinskih zaporedij sodeluje z vezavnimi mesti gostiteljskih celic, npr.: prolinsko bogata zaporedja so dokazali v malarijskem parazitu za *Plasmodium yoelii*, *Bordetella pertusis*, in *Mycobacterium laprae* (to je le nekaj primerov) (Razin, 1985). Enega takih proteinov so dokazali tudi v *M. gallisepticum* (PvpA), ki naj bi imel vlogo pritrjevanja (Boguslavsky in sod., 2000).

2.5.1 Imunogene molekule mikoplazem

Sistemi za prenos proteinov v zunajcelični prostor so pri bakterijah zelo pomembni. Doslej so pri *M. genitalium* odkrili nekaj proteinov (faktor sprožitve, DnaK, SRP, FtsY in SecA), ki premeščajo proteinske molekule iz citosola v zunajcelični prostor. Sistem je bolj preprost kot pri drugih bakterijah (Himmelreich in sod., 1996).

Pri mikoplazmah na splošno je dokazanih že kar nekaj imunogenih molekul, ki reagirajo z monoklonskimi protitelesi. Pri *M. gallisepticum* so bili opisani imunogeni proteini različnih velikostnih razredov: 56, 67 33 in 80 kDa (Benčina in sod., 1994) ter 100, 110 in 130 kDa (nevraminidaze) (Berčič in sod., 2008). Membranske imunogene proteine so odkrili tudi pri *M. synoviae*: 25–30 kDa in 45–50 kDa. Slednji predstavljajo potencialne lastnosti pritrjevanja hemaglutininov (Noormohammadi in sod., 1997). Večinoma so imunogeni membranski proteini, lipoproteini (Chambaud in sod., 1999).

O virulentnih dejavnikih mikoplazem je zelo malo znanega (na splošno o mikoplazmah kar nekaj, pri *M. cynos* je potrjena samo nevraminidaza (Berčič in sod., 2011). Vse vrste mikoplazem imajo specifične antigene, ki ne vežejo protiteles antiserumov drugih vrst. Take proteine ima tudi *M. cynos*. Iz psov, ki so preboleli CIRD, so s pomočjo konvalsentnega seruma in tehnike Western blot odkrili lise proteinov, ki predstavljajo imunogene proteine *M. cynos*. Narava slednjih še ni raziskana, ne ve se niti, ali bi protitelesa proti tem imunogenim proteinom preprečila okužbo (Chalker, 2005). Kot že omenjeno, psi lahko razvijejo odpornost na *M. cynos*. Do sedaj so bila odkrita pasja protitelesa, ki reagirajo s proteinom *M. cynos* molekulske mase 45 kDa (Rycroft in sod., 2007).

2.5.2 Encim nevraminidaza (sialidaza)

Sialidaze (nevraminidaze) so virulentni dejavniki (encimi) različnih mikroorganizmov. Igrajo pomembno vlogo pri mikrobnii kolonizaciji, vdoru v tkiva in povzročajo škodo celicam, ki imajo na površju molekule sialične oz. nevraminske kisline (Berčič in sod., 2008; May in Brown, 2009). Sialično kislino lahko mikroorganizmi sintetizirajo tudi *de novo* (Vimr in sod., 2004). Sialična kislina je pri sesalcih pomembna molekula in sodeluje v mnogih biopresesih. Najdemo jo na površini celic, v serumu, sluznicah in membranah golgijevega aparata (Zakrajšek, 2008). Mikroorganizmi lahko sialično kislino vgrajujejo v lipopolisaharidne kapsule in se s tem izognejo odzivu imunskega sistema (Harvey in sod., 2001) ali jo preprosto uporabijo kot substrat za pridobivanje energije ali vir dušika (Vimr in sod., 2004). Nevraminidaza (sialidaza, N-acilneuraminozil glikohidrolaza) je zunajcelična glukozidaza. Hidrolizira α -glukozidno vezano sialično kislino. Sialična kislina je lahko vezana na glikolipide, glikoproteine in oligosaharide. Nevraminidaze so večinoma monomeri, dimeri (*Clostridium chauvoei*), trimeri (*Clostridium septicum*) (Roggentin in sod., 1993). Molekulske mase nevraminidaz so zelo različne in se večinoma gibljejo med 40 in 125 kDa. So pa tudi izjeme: 250 (*Pasteurella multocida*) in 300 kDa (*Clostridium chauvoei*). *M. cynos* in *M. canis* izločata zunajcelično nevraminidazo (May in Brown, 2009; Zakrajšek, 2008; Bolha, 2009). Molekulske mase nevraminidaz pasjih mikoplazem so: *M. cynos* – 105 kDa, *M. canis* – 130 kDa in *M. molare* – 110 kDa (Berčič in sod., 2011).

2.6 MONOKLONSKA PROTITELESA

So monospecifična protitelesa, produkti enega klena limfocitov B, pridobljena *in vitro*. So nepogrešljiva orodja v molekularnih imunoloških tehnikah. *In vitro* sistem pridobivanja posnema dogodek *in vivo*. Protitelesa, ki nastajajo v telesu po srečanju z nekim antigenom, so sicer poliklonska, ker proti več epitopom enega proteina nastane več protiteles. Vendar pa posamezna celica B, ki se aktivira ob srečanju z določenim epitopom, in vse njene

potomke sintetizirajo protitelesa z enako specifiko. Monoklonska protitelesa služijo kot močno orodje pri raziskavah makromolekul ter celic. So pomemben del diagnostike v medicini (Nelson in sod., 2000; Vozelj, 2000).

2.6.1 Pridobivanje monoklonskih protiteles – hibridomska tehnologija

Hibridomska tehnologija je tehnika, pri kateri iz dveh različnih tipov celic istega vrstnega izvora (limfocitov B in mielomskih celic) s postopkom zlivanja celic dobimo hibridomske celice. To tehniko sta razvila Köhler in Milstein leta 1975. Postopek se začne z imunizacijo miške. Ponavadi jo imuniziramo trikrat. Prvič jo imuniziramo z antigenom, kateremu je dodan kompletni adjuvans, pri drugi imunizaciji antigen mešamo z nekompletnim adjuvansom. Pri tretji imunizaciji običajno uporabimo sam antigen. Sledi zlivanje celic B in mielomskih celic, kateremu sledi gojenje v selektivnem mediju, ki vsebuje HAT (hipoksantin, aminopterin, timidin) ter faza kloniranja, kjer pridobimo klone ene same hibridne celice. Najpogosteje se uporablja tehnika končnega redčenja (Walker, 2002). Že kar nekaj časa se selekcionira hibridome tudi s pretočnim citometrom z možnostjo sortiranja celic (Böhm in sod., 2004). Po kloniranju ugotovimo kateri klon proizvaja želena monoklonska protitelesa. Pri selekciji klonov si pomagamo s testom ELISA. S tem testom se prične tudi praktični del mojega diplomskega dela.

3 MATERIALI IN METODE

Postopek hibridomske tehnologije je bil izveden v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko, in sicer po standardnem protokolu (Köhler in Milstein, 1975). Navajam le kratke opise ključnih korakov in podatke, ki se nanašajo na antigen.

3.1 IMUNIZACIJA MIŠKE

Miška Balb/c je bila prvič imunizirana s celicami *M. cynos* (sev 896), ki so bile izolirane iz pljuč psička, ki je poginil zaradi pljučnice (Zeugswetter in sod., 2007).

Druga pozitivna imunizacija je bila opravljena s topnimi proteini *M. cynos*. Raztopina je imela enako sestavo kot raztopina antiga, ki smo jo kasneje uporabili za test ELISA. Antigene smo pripravili po naslednjem postopku: 200 ml kulture *M. cynos* smo centrifugirali pri 20.000 g 10 minut. Usedljivo celic smo resuspendirali v 400 µl 1 x PBS ter suspenzijo celic čez noč inkubirali pri sobni temperaturi. Sledilo je centrifugiranje pri 25.000 g 10 minut in odvzet je bil supernatant. Slednji je imel veliko nevraminidazno aktivnost in visok hemaglutinacijski titer (1:1280). Na ta način smo pridobili topne proteine *M. cynos*.

Fuzija, selekcija hibridomov in prvo kloniranje so bili opravljeni po standardnem protokolu (Liddell in Cryer, 1991).

Pred mojim sodelovanjem pri poizkusu so bile opravljene naslednje stopnje: fuzija celic B s celicami NSO, selekcija hibridomov s testom ELISA ter kloniranje. Metodologija in materiali so opisani v knjigi »Monoclonal antibodies: Principles and practice« (Goding, 1986) in se standardno izvajajo v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko, zato jih v tem delu dodatno ne bom opisoval.

3.2 DELO S HIBRIDOMI

Moje diplomsko delo se je pričelo s selekcijo enkrat kloniranih hibridomov. Hibridomi rastejo kot suspenzijska kultura v gojitvenem mediju DMEM (Sigma-Aldrich, ZDA), 10 % FBS (HyClone, ZDA) z 0,1 % gentamicina (Krka, Slovenija) v inkubatorju (Sanyo MC-17AC, Nemčija) pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂. Medij DMEM smo pripravili po navodilih proizvajalca in ga sterilizirali s filtriranjem skozi filter s porami velikosti 0,22 µm. Za gojenje hibridomov smo uporabljali tudi SFM oz. gojišče brez seruma (Hyclone, Thermo Scientific, ZDA). To gojišče smo dobili že pripravljeno v litrskih plastenkah.

Preprosto smo ga odmrznili in mu v čistem prostoru (Telstar Biostar, Španija) aseptično dodali gentamicin (80 mg/2 ml, Krka, Slovenija) do koncentracije 0,1 % (v/v). Tako pripravljeni gojišči smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.1 Gojenje klonov

Vsak klon smo vzporedno gojili v SFM z 0,1 % (v/v) gentamicina in DMEM, 10 % FBS (v/v) z 0,1 % gentamicina. Prva faza gojenja je potekala na mikrotiterskih ploščah (Biocompare Cellstar, ZDA). Gojili smo jih v 300 µl DMEM, 10 % FBS z 0,1 % gentamicina. Po selekciji smo v gojitvenih posodah volumna 40 ml (Greiner Bio One, Avstrija) gojili klone v 5 ml gojišča. Presajanja in druga aseptična dela smo opravljali v čistem prostoru (Telstar biostar, Španija). Delali smo v skladu z dobro laboratorijsko prakso in upoštevali aseptične tehnike. Ko so se kloni ustrezno namnožili in porabili hranila v gojišču, smo jih presadili v večje posode volumna 125 ml (Greiner Bio One, Avstrija). V slednjih je bilo 30 ml gojišča. Delali smo po naslednjem postopku: najprej smo celice aseptično prenesli v sterilne centrifugirke, ki smo jih centrifugirali na 900 obratih 10 min (Tehnica/centrtic 322A). Supernatant smo skrbno odpipetirali v drugo sterilno centrifugirko, jo označili in shranili za nadaljnje raziskave. Celice smo nato resuspendirali v 1 ml ustreznega medija in jih prenesli v nove gojitvene posode. Naredili smo tri presaditve v velikih gojitvenih posodah. Postopek gojenja in presajanja celic smo ponavljali, dokler nismo zbrali dovolj supernatanta za testiranje. Supernatante smo očistili s centrifugiranjem pri 3000 obratih 15 min.

3.2.2 Vpliv gojitvenega medija na rast hibridomov

Pri selekciji in v zgodnjih fazah gojenja smo uporabljali samo DMEM, 10 % FBS z 0,1 % gentamicina. To je standardno gojišče za pridobivanje monoklonskih protiteles, vendar njegova sestava ni natančno definirana, saj je zelo kompleksna. Poleg tega nam pri čiščenju protiteles povzročajo težave serumski proteini (predvsem je moteč goveji IgG), ki se oborijo poleg imunoglobulinov in tako predstavljajo nečistočo. Zato smo vzporedno vse klone gojili tudi v mediju SFM z 0,1 % gentamicina, ki ne vsebuje seruma. V obe gojišči smo nasadili približno enako koncentracijo celic, jih gojili enako dolgo in nato preverili, ali vsi kloni enako dobro uspevajo v obeh gojiščih in ali se vsebnost mAb v supernatantih kaj razlikuje. Primerjavo smo izvajali s pomočjo mikroskopa Olympus CK2. Koncentracije celic smo v vidnem polju ocenili z visoko (+++), srednje visoko (++) in nizko (+). Pri tem smo morali upoštevati tudi redčitve, saj nismo zmeraj presadili vseh celic. Rezultate

hitrosti rasti smo lahko potrdili tudi po centrifugiraju celic s tem, da smo primerjali količine sedimentiranih celic.

3.2.3 Shranjevanje klonov

Pred in po selekciji smo zamrznili hibridome, ki so pokazali pozitiven rezultat na protitelesa v testu ELISA. Zamrznili smo jih v tekočem dušiku, kjer ohranijo živost (Goding, 1986). Sestava gojišča za zamrzovanje je naslednja: 70 % gojišča DMEM, 20 % FBS in 10 % DMSO (dimetilsulfoksida, Sigma D2650, ZDA). Najprej smo z Neubauerjevo števno komoro prešteli celice in izračunali optimalno koncentracijo celic ($2,5 \times 10^7$) (Narat, 2004). Ohlajene celice smo suspendirali v ohlajenem mediju DMEM, 20 % FBS. DMSO smo dodali na koncu, saj je toksičen za celice. Posodice s celicami in gojiščem smo dali v ohlajeno posodo za zamrzovanje, v kateri je bil izopropil alkohol, ki omogoča postopno zamrzovanje s hitrostjo 1 °C/minuto. Posodo smo za 24 ur postavili v hladilno omaro z -70 °C, nato smo posodice prestavili v kontejner s tekočim dušikom pri -196 °C. V delovno shemo kontejnerja smo označili mesta, kjer se nahajajo posamezni kloni. Vsak posamezen klon smo zamrznili v dveh serijah v 2 ml posodicah.

Odtaljevanje je potekalo po sledečem postopku. Kulture hibridomov, ki smo jih shranili v tekočem dušiku, smo morali čim hitreje odtaliti. Zato smo uporabili vodno kopel (Uniequip, Uniterm WA22, Nemčija) segreto pri 37 °C. Ko se je kultura odtalila, smo posodico popršili s 96 % etanolom (Sigma-Aldrich, ZDA) in obrisali s staničevino. Predhodno smo odpipetirali 8 ml segretega gojišča DMEM, 20 % FBS z 0,1 % gentamicina v 10 ml centrifugirko in prenesli vso odtaljeno kulturo vanjo. Centrifugirali smo 10 minut pri 1000 obratih na minuto (Tehtnica/centrtic 322A). Odstranili smo supernatant. Ponovno smo suspendirali pelet v gojišču DMEM, 20 % FBS z 0,1 % gentamicina. Gojišče DMEM, 20 % FBS smo uporabili samo pri prvem presajanju, ker FBS poviša delež preživelih celic.

3.3 PRESEJALNI TEST

3.3.1 Test ELISA

Hibridome smo gojili na mikrotitrskih ploščah s 96 jamicami (TPP, Švica). S testom ELISA smo preverjali prisotnost specifičnih protiteles v supernatantih posameznih jamic. Test ELISA, ki smo ga izvedli, je posredni tip testa ELISA.

Kot antigen smo uporabili topne proteine *M. cynos*. Postopek priprave je opisan v poglavju 3.1. Antigen smo redčili v razmerju 1:50 v PBS s pH 7,2. V vsako jamico na mikrotiterski plošči za test ELISA smo nanesli 50 µl redčenega antiga. Inkubirali smo 24 ur pri 4 °C v hladilniku.

Sledila je faza spiranja. Spirali smo na avtomatskem spiralniku (Biotek, ELx-50, ZDA). Program je sestavljen iz sedmih korakov. Najprej odsesa suspenzijo antiga. Nato napolni jamicice z 300 µl 0,05 % Tween v raztopini PBS in jih nato izprazni. Slednji postopek spiranja ponovi še dvakrat.

Sledila ja faza zasičenja prostih vezavnih mest na dnu luknjic mikrotiterskih plošč. V vsako jamico smo nanesli 300 µl pufer za blokiranje. Ta vsebuje 1 % BSA v 0,5 % Tween v PBS. Blokada je potekala 1 uro pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo pufer za blokiranje preprosto odlili z mikrotiterske plošče.

Sledil je nanos vzorcev – supernatantov hibridomov in kontrolnih vzorcev. Najprej smo naredili shemo, ki je prikazovala kateri klon iz gojitvene plošče smo vnesli v posamezno jamico na mikrotiterski plošči namenjeni za test ELISA. V posamezno jamico smo nanesli po 50 µl supernatanta posameznega klona. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili mišji imunski serum v redčitvi 1:100 v PBS. Kot negativne kontrole smo uporabili obe vrsti gojišč DMEM, 10 % FBS in SFM, ter raztopino PBS. Inkubirali smo 24 ur pri 4 °C v hladilniku. Po končani inkubaciji smo iz jamic odpipetirali supernatante. Pri pipetiranju smo vsakič uporabili druge nastavke (tipse).

Sledilo je ponovno spiranje na avtomatskem spiralniku (Biotek, Lx-50, ZDA) po enakem protokolu kot prej.

Naslednja faza je bila faza inkubacije v sekundarnih protitelesih. Sekundarna protitelesa so bila označena s hrenovo peroksidazo (uporabljali smo kozja protitelesa proti mišjim regijam F_{ab}, Sigma A9917, ZDA). Ta protitelesa so bila v založni raztopini v redčitvi 1:10 v glicerolu. Hranjena so bila v zamrzovalniku pri -20 °C. Za test smo potrebovali protitelesa v redčitvi 1:30.000 v PBS. V vsako jamico smo nanesli 50 µl raztopine protiteles. Inkubirali smo 1 uro pri 37 °C.

Ponovno je sledilo spiranje na avtomatskem spiralniku. To spiranje se je razlikovalo od prejšnjih dveh spiranj. Avtomatski spiralnik je najprej dvakrat spiral z raztopino 0,05 % Tween v PBS. Zadnje spiranje je bilo izvedeno z raztopino PBS.

Pripravili smo substrat za barvno reakcijo. ABTS je substrat za hrenovo peroksidazo, ki je bila konjugirana na kozja protitelesa. Uporabili smo ABTS proizvajalca Thermo Scientific, ZDA. Substrat smo po navodilih proizvajalca pripravili tik pred uporabo. Pripravili smo substratni pufer, tj. 10 mM fosfat-citratni pufer s pH 5,0. Odmerili smo 24,3 ml 0,1 M citronske kisline (Sigma-Aldrich, ZDA), ki smo ji dodali 25,7 ml 0,2 M dibazičnega natrijevega fosfata (Sigma-Aldrich, ZDA) in nato še deionizirano vodo do končnega

volumna 100 ml. V 10 ml substratnega pufra smo raztopili eno tableto ABTS in 10 µl 30 % vodikovega peroksida (Sigma-Aldrich, ZDA). Rahlo smo mešali na magnetnem mešalu. V vsako jamico smo z multipipeto dodali 50 µl substrata in inkubirali v temi pri sobni temperaturi. Meritve smo izvajali po 30- in 60-minutni inkubaciji na avtomatskem spektrofotometru (Biotek, EL808), ki je podprt z računalniško programsko opremo KC Junior. Merili smo pri valovni dolžini 405 nm. Na koncu merjenja absorbance smo v vsako jamico dodali 25 µl raztopine, ki ustavi encimsko reakcijo, to je 1 % SDS.

3.4 IZOLACIJA mAb IZ SUPERNATANTOV HIBRIDOMOV

3.4.1 Obarjanje in koncentriranje protiteles

V primeru, da se pri encimsko imunske testu ne dobi želenih rezultatov, je potrebno supernatante gojišč posameznih hibridomov skoncentrirati, ker so morda koncentracije protiteles zelo nizke. To smo naredili s postopkom obarjanja z amonijevim sulfatom (Merck, Nemčija), ki temelji na principu izločanja proteinov (obarjanja) v prisotnosti soli. Za uspešno obarjanje mišjih imunoglobulinov so potrebne 45 do 50 % nasičene raztopine amonijevega sulfata.

Najprej smo pripravili 100 % nasičeno raztopino amonijevega sulfata. To smo naredili en dan pred obarjanjem, da je bila raztopina pri sobni temperaturi res 100 % nasičena. V sterilne čaše smo prenesli vso količino supernatanta določenega hibridoma in mu počasi dodajali enako količino 100 % nasičenega amonijevega sulfata kot je bil volumen vzorca. Tako smo na koncu dosegli 50 % nasičenje z amonijevim sulfatom. Raztopino amonijevega sulfata smo dodajali ob rahlem mešanju na magnetnem mešalu in nato čašo prenesli na stresalnik (Tehtnica, Slovenija). Na magnetnem mešalu (Tehtnica, Slovenija) smo oborili še ostale vzorce. Po dveh urah vzpostavljanja ravnotežja med oborjenimi proteini in soljo smo vzorce prenesli v centrifugo in centrifugirali 15 minut na 10.000 obratov (Centrifuga RC5C Sorvall Instruments, Du Pont (rotor GSA)). Po centrifugiranju smo s centrifugirkami ravnali zelo previdno in jih nismo stresali, da ni prihajalo do prehajanja protiteles nazaj v supernatant. Previdno in počasi smo odlili supernatant. Ostanke supernatanta smo poskiali s sterilnimi pasterjevimi pipetami. Pelet smo resuspendirali v 1 ml PBS in shranili v hladilniku pri 4 °C.

3.4.2 Čiščenje protiteles

V prejšnjem koraku smo protitelesa skoncentrirali, ker je bila koncentracija protiteles v supernatantih nizka, vendar pa je raztopina protiteles vsebovala še veliko amonijevega sulfata. Slednjega smo odstranili s postopkom dialize. Uporabili smo dializno membrano v obliki cevke (Sigma, ZDA). Dializna membrana je široka 23 mm. Ker ima membrana pore velike 12 kDa, smo se velike večine proteinov, ki so manjši kot 12 kDa, med procesom dialize znebili. Dializno membrano smo najprej narezali na dolžine 8–10 cm. Dializno membrano smo aktivirali tako, da smo jo 5 minut kuhalili v navadni vodi. Membrano smo upognili v obliki črke U in vanjo vnesli vzorec skoncentriranega vzorca protiteles. Dializno membrano smo pritrudili na pipeto tako, da ko smo jo postavili v čašo s PBS, je bil spodnji del potopljen, zgornji pa pritrjen na pipeto. Pipeta nam je služila kot držalo. Tako smo preprečili stekanje vode v dializno cevko in nismo izgubili vzorca. Medtem je v spodnjem delu, ki je bil v raztopini, prihajalo do izmenjave soli (amonijevega sulfata). V posamezni časi je sočasno potekala dializa 3–4 vzorcev. Dializa je potekala 3 dni v hladilniku (72 ur). Po 72 urah smo odpipetirali dializni ostanek iz cevaste dializne membrane v epice, jih označili in shranili v hladilnik pri 4 °C.

3.5 TESTIRANJE IN DELNA KARAKTERIZACIJA PROTITELES *M. cynos*

3.5.1 Detekcija protiteles z metodo DIBA

DIBA ali »dot immunobinding assay« je encimsko imunski test pri katerem vzorec nanesemo na membrano v obliki pike (Narat in sod., 2004; Benčina in sod., 2005).

Test DIBA smo izvedli na membrani PVDF (poliviniliden fluorid; Millipore, ZDA). Na membrano smo narisali mrežo kvadratkov velikosti $0,25 \text{ mm}^2$ (0,5 x 0,5 cm). Membrano smo aktivirali tako, da smo jo za nekaj sekund pomočili v 100 % metanol (Merck, Nemčija) in jo nato prenesli v banjico z deionizirano vodo za 20 minut.

3.5.1.1 Encimsko imunski test – DIBA za dokaz imunoglobulinov v supernatantih hibridomov

Ne glede na to, da smo na podlagi rezultatov testa ELISA pri selekciji klonov ugotovili, da nek klon proizvaja protitelesa, smo postopek dokazovanja specifičnih protiteles ponovili z encimskim imunskim testom (test DIBA). Membrano smo pripravili in aktivirali po navodilih iz prejšnjega odstavka. Počakali smo, da se je membrana posušila. Na osušene kvadratke smo nanesli 3 µl vzorcev supernatantov hibridomov. Za pozitivno kontrolo smo nanesli imunski serum v redčitvi 1:100 v PBS. Uporabili smo tri različne negativne kontrole: SFM; DMEM, 10 % FBS; PBS. Ko se je nanesena kapljica suspenzije posušila,

smo membrano blokirali z 0,5 % Tween PBS 45 minut. Membrano smo nato inkubirali 45 minut v suspenziji sekundarnih protiteles (kozja protitelesa proti mišjim IgG (Sigma, A9917)). Sekundarna protitelesa so bila redčena v PBS v razmerju 1:1500. Označena so bila s hrenovo peroksidazo. Po inkubaciji smo membrano inkubirali v 0,05 % Tween PBS dvakrat po 15 minut in nato še enkrat v PBS 10 minut. Po spiranju smo prenesli membrano na čisto ravno površino in jo prelili s substratom za hrenovo peroksidazo True blue (Kirkegaard & Perry Laboratories, ZDA). Pri pozitivnih vzorcih, ki so vsebovala mišja protitelesa, se je pojavilo modro obarvanje, ki je bilo posledica delovanja encima in substrata. Vzorci, ki niso vsebovali mišjih protiteles, se niso obarvali. Barvno reakcijo smo ustavili ob primerni stopnji obarvanja membranskega traka s pozitivno kontrolo, da ni prišlo do lažnih pozitivnih rezultatov. To smo storili tako, da smo membrano za nekaj minut pomočili v deionizirano vodo.

3.5.1.2 Encimsko imunski test – DIBA za dokaz specifičnih protiteles

S posrednim imunskim testom smo preverili specifičnost protiteles v vzorcih supernatantov. Na pripravljeno in aktivirano membrano (priprava je opisana v poglavju »3.6.1. Detekcija protiteles z metodo DIBA«) smo nanesli po 3 µl antiga *M. cynos* v dveh redčitvah, 1:20 in 1:30 (sev 896, Zeugswetter in sod., 2007), in počakali, da se vpije. Antigen smo v dveh različnih redčitvah nanesli le prvič, da smo ugotovili katera redčitev je najbolj primerna in smotrna za uporabo. Membrano smo narezali tako, da je vseboval vsak trakec tri kvadratke velike 0,25 mm². Dva kvadratka sta bila namenjena za vsako posamezno redčitev antiga *M. cynos*, eden pa je bil namenjen označevanju in manipulaciji trakcev s pinceto. Membrano smo inkubirali v supernatantih hibridomov 45 minut. Membrano smo blokirali z 0,5 % Tween v PBS 45 minut. Trakove membran smo prestavili v posodico s sekundarnimi kozjimi proti mišjimi protitelesi (Sigma, A9917), ki so bili redčeni 1:1500. Inkubirali smo 45 minut. Spirali smo v 0,05 % Tween PBS dvakrat in nato še enkrat v PBS 10 minut. Dodali smo substrat True blue (Kirkegaard & Perry Laboratories, ZDA) in počakali na barvno reakcijo. Uporabljali smo enake pozitivne in negativne kontrole kot v poglavju 3.5.1.1. Barvno reakcijo smo prekinili s kratko potopitvijo membranskih trakov v deionizirano vodo.

3.5.2 Elektroforeza SDS-PAGE

3.5.2.1 Priprava posodice za vlivanje gela

Za elektroforezo SDS-PAGE smo uporabili opremo Multiple Gel Caster (Amersham Biosciences, SE 260). Najprej smo sestavili komplet za vlivanje gelov. To je preprost kalup z gumijastim dnom na katerega s štirimi sprednjimi vijaki privijemo stekleno in kovinsko ploščico ob nosilec, z vmesnima distančnikoma na levi in desni strani. Obe

ploščici in distančnik smo predhodno poravnali na ravni podlagi. S stranskima vijakoma smo dodatno potisnili gumijasto dno proti vrhu in s tem zatesnili dno kalupa. Preden smo se lotili vlivanja gela, smo z deionizirano vodo preverili vodotesnost. Prednja ploščica je steklena, zato omogoča lažje opazovanje potovanja obarvanih lis in s tem tudi lažji nadzor nad elektroforezo. Ko je bil gel vlit, smo ga skupaj z obema distančnikoma, stekleno in kovinsko ploščico ter glavničkom prenesli v drugo posodo, elektroforetsko banjico in ga pritrdili s posebnimi močnimi ščipalkami.

3.5.2.2 Priprava gela za elektroforezo SDS-PAGE

Najprej smo pripravili ločevalni gel. Zamreženost ločevalnega gela smo določili glede na molekulske mase proteinov, ki smo jih ločevali. Uporabili smo 15 % ločevalni gel. Slednjega smo pripravili 10 ml. Sestava ločevalnega gela je prikazana v preglednici 4. Gel smo pripravili v stekleni čaši. Najprej smo odpipetirali 2,3 ml dH₂O. Dodali smo 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), zatem 0,1 ml 10 % APS in 0,1 ml 10 % SDS. Nato smo dodali 4 µl reagenta TEMED – tetrametiletilendiamina (Sigma-Aldrich, ZDA). Raztopino smo dobro premešali, da se je TEMED porazdelil, saj je zelo viskozen in bi lahko v nasprotnem primeru prišlo do neenakomerne zamreženosti gela. Na koncu smo dodali še predpripravljeno mešanico 30 % akrilamid/bis-akrilamida (Sigma, ZDA). Gel smo vili v kalup do 3,5 cm pod zgornjim robom. Nanj smo ob strani kalupa počasi nalili približno 0,5 ml n-butanola. Slednji je precej viskozen, vendar lažji od vode in se lepo porazdeli po površini in s tem poravna zgornji rob ločevalnega gela. Kot indikator strjevanja ločevalnega gela smo uporabili preostanek gela, ki nam je ostal v čaši. Ko se je slednji strdil, je bil tudi gel v kalupu strjen. To je trajalo 1–2 uri. Potem smo odlili n-butanol in gel sprali z deionizirano vodo. Preostanke vode smo popivnali s staničevino. Velikost ločevalnega gela je bila 8,3 x 7,9 cm (52,5 cm²).

Preglednica 4: Sestava 15 % ločevalnega gela

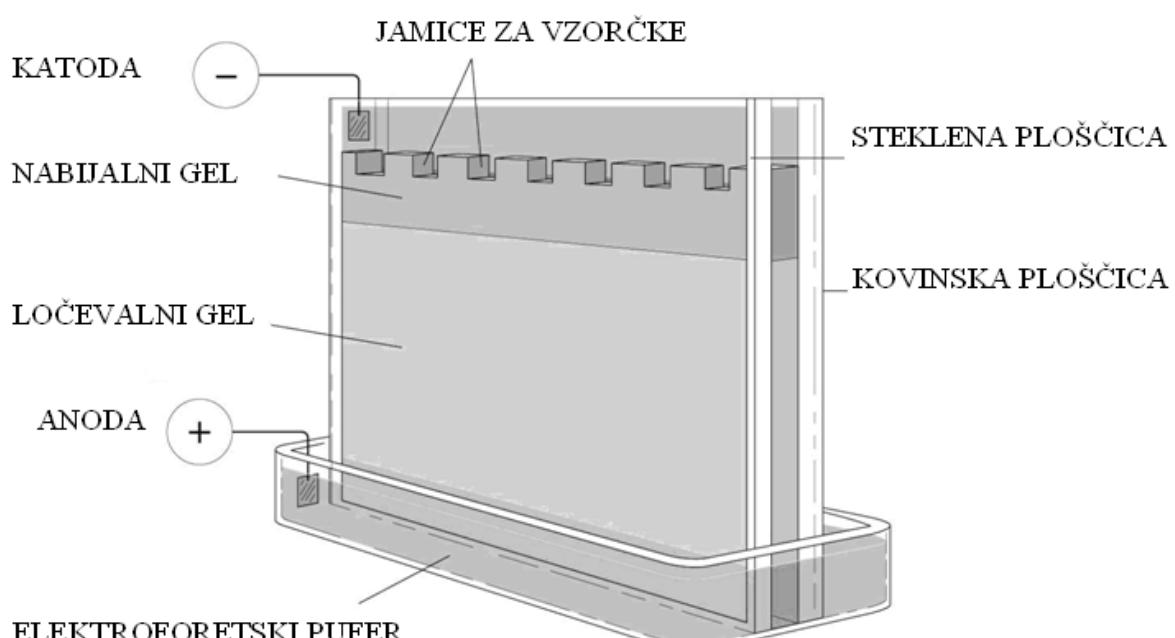
Snov	Volumen [ml]
Deionizirana H ₂ O	2,3
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5
10 % APS	0,1
10 % NaDS	0,1
TEMED	0,004
30 % akrilamid/bis-akrilamid	5,0

Koncentracijski gel je 4 % poliakrilamidni gel. Njegova sestava je podobna sestavi ločevalnega gela. Sestavine se razlikujejo le v pH pufra Tris in količinah vstopnih snovi (preglednica 5). Pripravili smo ga po istem postopku kot ločevalni gel. Pri vlivanju gela v

kalup nad ločevalni gel smo morali paziti, da nismo nalili gela do vrha, saj je bilo potrebno vstaviti še glavniček z luknjicami. Brez vstavljenega glavnička je gel neuporaben, saj v gelu naredi jamice, ki ločujejo vstopne vzorce. Uporabili smo glavniček, ki ima samo dve jamici. Eno manjšo na levem robu gela, kamor smo nanesli standard in eno veliko jamico, ki se razteza čez preostalo širino gela. V slednjo smo vnesli pripravljen antigen *M. cynos*. Zakaj tako, je pojasnjeno v poglavju 3.7.2. Celoten vlit gel je prikazan na sliki 3.

Preglednica 5: Sestava 4 % koncentracijskega gela

Snov	Volumen [ml]
deionizirana H ₂ O	2,3
1,5 M Tris (pH 6,8)	1,26
10 % APS	0,05
10 % NaDS	0,05
TEMED	0,005
30 % akrilamid/bis-akrilamid	0,83



Slika 3: Gel za SDS-PAGE elektroforezo (Protein Methods, 2011)

3.5.2.3 Priprava bakterijskih proteinov za elektroforezo SDS-PAGE

Bakterijske proteine smo pripravili v nanašalnem pufru. Nanašalni pufer služi usedanju vzorca v jamico na gelu, ga naredi viskoznega in teže raztapljačega, da nam vzorec ne suspendira v elektroforetski pufer. Pripravili smo 2x koncentriran nanašalni pufer, ki smo ga na koncu zmešali z enako količino vzorca. Sestava nanašalnega pufra je opisana v preglednici 6. Receptura ustreza pripravi 1,6 ml pufra. Zaporedje dodajanja ni pomembno, najlažje je, če na začetku v posodico odpipetiramo zahtevano količino deionizirane vode. β -merkaptoetanol dodajamo v digestorijo, ker je močan oksidant in draži sluznico, dihalo in kožo. Glicerol pipetiramo z odrezanim nastavkom zaradi njegove velike viskoznosti.

Preglednica 6: Sestava nanašalnega pufra

Snov	Volumen [μ l]
deionizirana H ₂ O	800
1,5 M Tris HCl (pH 6,8)	200
Glicerol (100 %)	160
10 % NaDS	320
β -merkaptoetanol	80
Bromfenolmodro 0,25 %	40

Vzorec redčine antigenov *M. cynos* smo zmešali z enakim volumnom 2x koncentriranega nanašalnega pufra. V našem primeru smo v veliko jamico nanesli 500 μ l pripravljenega antiga s pufrom. Količino smo izračunali glede na površino normalne jamice na gelu (v takšno jamico gre do 50 μ l pripravljenega vzorca antiga) v primerjavi s površino ene velike jamice. Sorazmerno s površinami smo torej povečali količino pripravljenega antiga. Vzorec z nanašalnim pufrom je bilo potrebno predhodno obdelati. Epico, v kateri smo imeli pripravljeno mešanico smo vreli 5 minut, da je prišlo do linearizacije proteinov (reducent β -merkaptoetanol).

3.5.2.4 Referenčni markerji

Za karakterizacijo proteinskega profila *M. cynos* smo uporabili referenčni marker (Fermentas, Page RulerTM Prestained Protein Ladder, SM0671). Slednji vsebujeobarvane markerje molekulskega mas: 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 in 10 kDa. Pri vsaki elektroforezi SDS-PAGE smo porabili 5 μ l standarda. Referenčnega markerja nam ni potrebno kuhati! Referenčni standard je tribarvni proteinski standard. Protein molekulske mase 70 kDa je obarvan rdeče, 10 kDa zeleno, ostali so obarvani modro.

3.5.2.5 Priprava pufra za elektroforezo SDS-PAGE

Elektroforetski pufer je sestavljen iz 3 g TRISMA base (Sigma-Aldrich, ZDA), 14,4 g glicina in 1 g NaDS (Sigma-Aldrich, ZDA). Vse sestavine smo natančno stehiali in jih kvantitativno prenesli v litrsko merilno bučko, ki je že vsebovala dobro polovico deionizirane vode. Potem, ko so se sestavine raztopile, smo bučko do oznake dopolnili z deionizirano vodo. V banjico za elektroforezo smo do oznake nalili pufer, ki smo ga morali prav tako doliti na hrbtno stran gela, saj v nasprotnem primeru elektroforeza ne bi potekala pravilno.

3.5.2.6 Pogoji elektroforeze SDS-PAGE

Banjico z gelom smo pokrili s pokrovom in ustrezno priključili elektrode v vir električne napetosti. Elektroforeza SDS-PAGE je potekala v dveh fazah. V prvi fazi se je poravnala frontna linija vzorcev in vzorci so dosegli ločevalni gel. V tej fazi smo uporabili napetost 80 mV. V drugi fazi, t. i. fazi ločevanja, smo uporabili napetost 140 mV. Ločevanje je potekalo od 4 do 5 ur. Elektroforezo SDS-PAGE smo spremljali in jo zaključili potem, ko je frontna linija barvila zapustila gel oz. se je spodnji marker približal robu gela, ki je bil bližje anodi.

3.5.3 Optimizacija pogojev za elektroforezo SDS-PAGE

Da pri elektroforezi SDS-PAGE ne bi porabili preveč ali premalo vzorca antigena *M. cynos*, je bilo potrebno določiti optimalno redčitev vzorca proteinov *M. cynos*. Zato smo v tri jamice na gelu vnesli različne redčitve *M. cynos*. Pripravili smo redčitve v razmerjih 1:10, 1:20 in 1:40. Po končani elektroforezi SDS-PAGE smo opravili še prenos na membrano po postopku, ki je opisan v nadaljevanju. Membrano smo po prenosu obarvali z barvilom Ponceau S rdeče (0,2 % Ponceau S, 1 % ocetna kislina). Glede na stopnjo obarvanja smo se odločili s katero koncentracijo antigena *M. cynos* bomo delali naprej.

3.6 BARVANJA PROTEINOV *M. cynos*

3.6.1 Barvanje z barvilm Coomassie blue

Barvanje z barvilm Coomassie brilliant blue R-250 (Pharmacia, ZDA) je ireverzibilno barvanje. Za barvanje gela smo uporabili raztopino naslednje sestave: 225 ml 100 % metanola (Merck, Nemčija) z 225 ml deionizirane vode in 0,5 g barvila Comassie blue. Tuk pred uporabo smo dodali še ocetno kislino (Merck, Nemčija) v končni koncentraciji 10 %. Ocetno kislino smo dodali v digestoriju, saj hlapi dražijo oči in dihalo. Gel smo barvali dve uri. Barvanje bi se lahko skrajšalo v mikrovalovni pečici (50 sekund pri srednji jakosti). Po barvanju smo barvilo odlili in gel razbarvali v 437,5 ml dH₂O s 25 ml 100 % metanola z

ocetno kislino do 7,5 % (v/v) končne koncentracije. Tako smo inkubirali 24 ur. Po potrebi smo razbarvanje ponovili. Tudi v fazi razbarvanja bi lahko uporabili mikrovalovno pečico (podrobni parametri te vrste razbarvanja in učinki še niso preučeni).

Za barvanje membran po prenosu proteinskega profila z barvilm Coomassie blue smo uporabili drugačen postopek. V 50 ml 100 % metanola in 50 ml dH₂O smo dodali 0,1 g barvila Coomassie blue. Membrano v petrijevki smo prelili s toliko barvila, da je bila prekrita. S pretakanjem barvila preko membrane smo barvanje zaključili po dveh minutah. Membrano smo razbarvali v enaki raztopini kot gel. Razbarvanje smo lahko spremljali, saj je slednje trajalo manj kot dve uri (trajanje je odvisno od želene stopnje razbarvanja).

3.6.2 Barvanje z barvilm Ponceau S rdeče

Proteine smo reverzibilno obarvali tudi z barvilm Ponceau S rdeče (Sigma-Aldrich ZDA). Pripravili smo raztopino 0,2 % barvila Ponceau S in dodali 1 % 100 % ocetne kisline. Membrano smo z barvilm Ponceau S barvali preden smo jo blokirali v 0,5 Tween v PBS, kasneje več ne. S tem barvanjem smo preverili ali je bil prenos proteinskega profila uspešen. Membrano v petrijevi plošči smo prelili s pripravljenou raztopino barvila Ponceau S. Po nekaj minutah barvanja smo jo prestavili v deionizirano vodo. Po potrebi smo deionizirano vodo zamenjali in spirali do želene obarvanosti. Nato smo membrano prenesli v čisto, novo PVC (polivinilklorid) vrečko in jo poskenirali. S PVC vrečko smo jo zaščitili pred umazanjem in izsušitvijo.

3.7 DETEKCIJA SPECIFIČNIH REAKCIJ S PROTITELESI

3.7.1 Prenos proteinov *M. cynos* po Westernu

Za začetek smo pripravili raztopine, ki smo jih potrebovali za prenos proteinskega profila na membrano:

1. CAPS

Pripravili smo 10x založno raztopino CAPS. Stehtali smo 22,13 g CAPS (Sigma-Aldrich, ZDA) in ga raztopili v 900 ml dH₂O. Titrirali z 2 N NaOH do pH 11 in dopolnili z dH₂O do 1 l.

2. EBP (pufer za prenos na membrano, 10 mM CAPS v 10 % metanolu)

100 ml CAPS in 100 ml 100 % metanola smo vlili v merilno bučko in dopolnili do 1 l.

3. Poleg 100 % metanola smo pripravili še 50 % metanol.

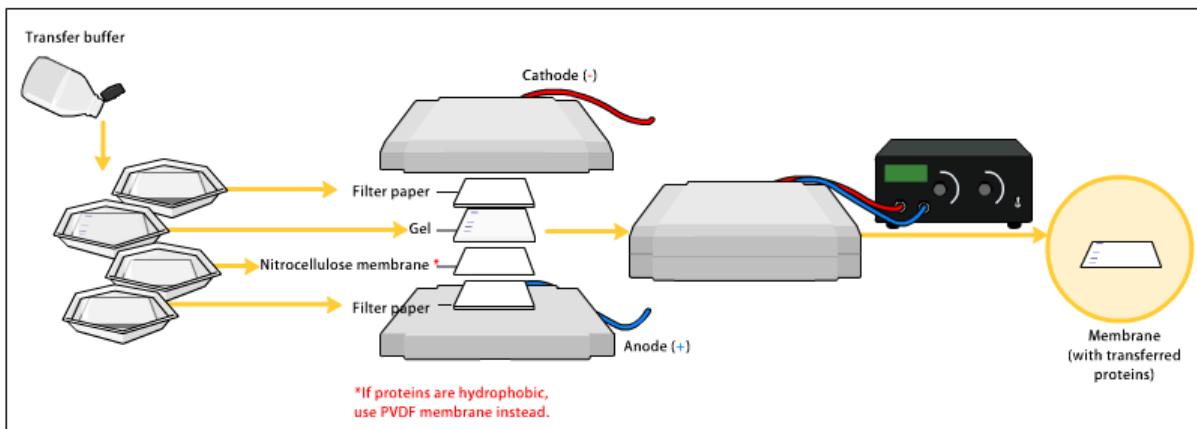
Po elektroforezi SDS-PAGE smo vzeli gel iz banjice in previdno razprli stekleno in kovinsko ploščico. Pri tem je ostal gel na kovinski ploščici. Odstranili smo del 4 % gela in ga zavrgli. Ozek pas 4 % gela nad ločevalnim gelom smo pustili, da smo za prenos

proteinskega profila odrezali večjo membrano kot bi jo sicer potrebovali. Slednja je bila tako po prenosu proteinskega profila na vrhu brez proteinov, kar smo s pridom izkoristili kot prostor za označevanje in rokovanje membrane s pinceto. Označili smo spodnji desni vogal na gelu, da smo se lahko orientirali. Izmerili smo dimenzijske gela in izračunali njegovo površino. Izrezali smo 8 natančno tako velikih filter papirjev (Munktell, Nova blot, Švedska) in eno natančno tako veliko membrano PVDF (Millipore, velikost por 0,45 µm). To membrano smo po zgornji širini označili z 0,5 cm velikimi razmaki in preko zaščitnega papirja, v katerem je membrana hranjena, odtisnili na membrano črkovno ali številčno zaporedje, ki nam je bilo kasneje v pomoč pri rezanju membrane v trakove. Gel smo namočili v 100 ml EBP za 5 minut. Najprej smo s črno žičko priklopili anodno ploščo na napravo (ALT, Pharmacia LKB Multiphor II, ZDA). Na anodni plošči smo začeli sestavljeni »elektroblot sendvič«. Nanjo smo najprej postavili 4 v EBP namočene filter papirje, na katere smo položili membrano PVDF, ki je bila predhodno za nekaj sekund namočena v 100 % metanol in se 5 minut inkubirala v pufru EBP. Pri polaganju membrane v sendvič smo bili pozorni na to, da je bilo lice membrane obrnjeno navzgor. Na membrano smo položili gel. Pri tem koraku smo bili pozorni na orientacijo gela glede na membrano, kar smo si tudi zabeležili. Sledila je še zadnja plast 4-ih filter papirjev. Celotna shema priprave je lepo prikazana na sliki 4. Zelo pomembno je tudi, da smo iz sestavljenega sendviča iztisnili vse mehurčke zraka. Ti bi lahko tekom prenosa ovirali sam proces in pri tem povzročali nepravilnosti. Mehurčke zraka smo odstranili s čistim steklenim valjastim predmetom, v našem primeru je bil to čist merilni valj brez podstavka. Sendvič smo zelo previdno pokrili s katodno ploščo, tako da nismo zamknili katere izmed plasti. Priklopili smo rdečo žičko in na drugi strani preko vmesnika vključili vtič v vir napetosti. Predhodno smo si izračunali napetost, ki je potrebna za prenos proteinskega profila po enačbi:

$$U = P_G * 0,8 \quad \dots(1)$$

$$\begin{aligned} U & \dots \text{napetost [mA]} \\ P_G & \dots \text{površina gela [cm}^2\text{]} \end{aligned}$$

Napetost, ki smo jo izračunali, smo nastavili na viru napetosti. Glede na to, da je gel 15 %, je prenos na membrano potekal 1 uro in 10 minut. Ko smo zaključili s prenosom, smo napravo počistili z deionizirano vodo. Gel smo obarvali z barvilkom Coomassie blue in s tem preverili uspešnost prenosa. Membrano smo obarvali z reverzibilnim barvilkom Ponceau S rdeče. Oba postopka barvanja sta opisana v poglavju 3.6.



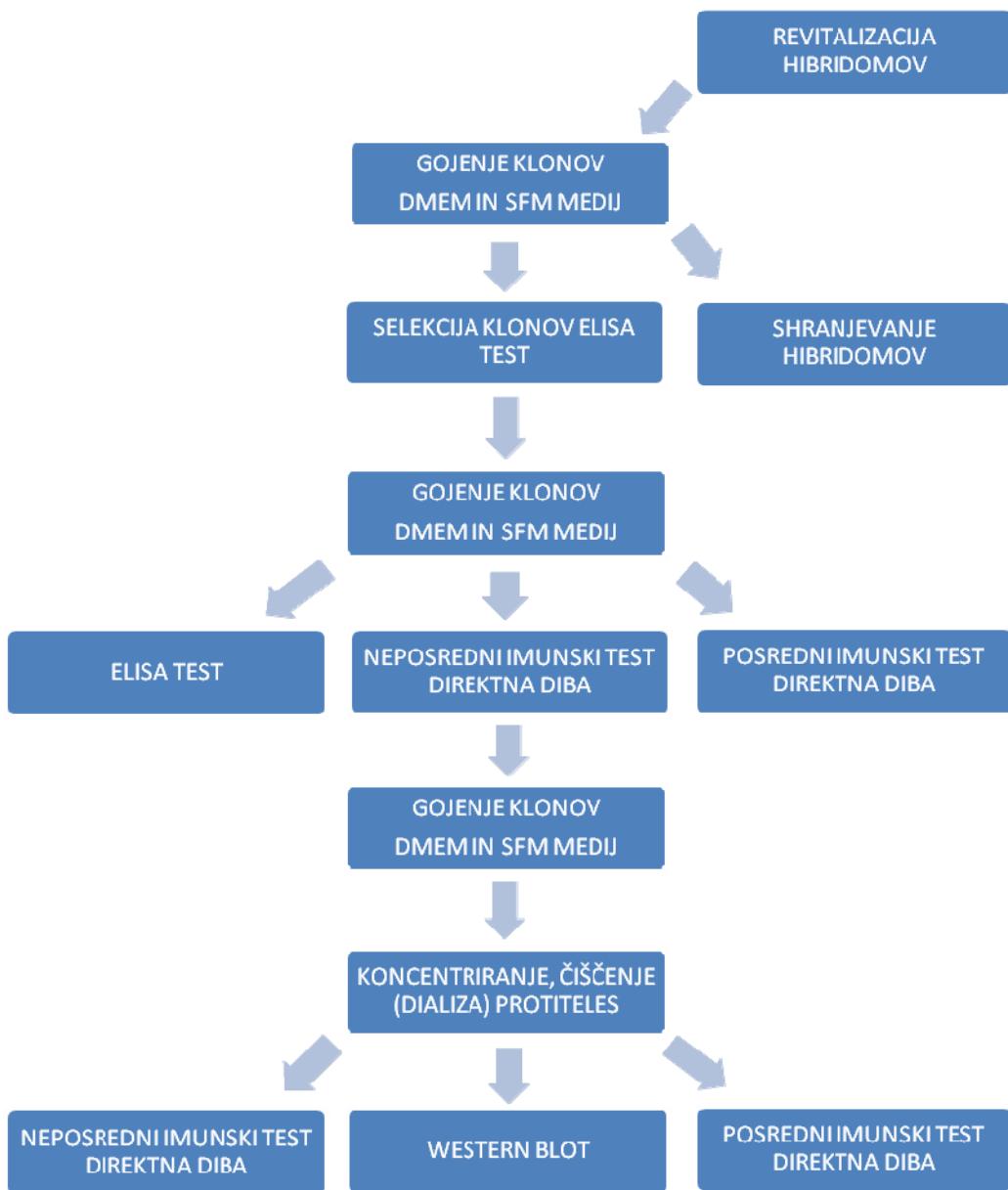
Slika 4: Prenos proteinov iz gela na membrano (Western blot, 2011)

3.7.2 Specifične reakcije med proteini na membrani in protitelesi

Postopek encimsko imunskega testa je v tej nalogi že opisan, vendar se barvanje proteinskega profila na membrani razlikuje bolj v izvedbi kot v sami metodi. Po zaključenem prenosu na membrano smo morali membrano najprej blokirati. To smo storili s 45-minutno inkubacijo membrane v 0,5 % Tween v PBS. Po blokadi smo iz membrane izrezali referenčni standard. Iz preostanka membrane, ki smo ga označili z 0,5 cm velikimi razmiki, smo potrebovali toliko trakov kot smo imeli vzorcev za testiranje na prisotnost specifičnih imunskeih protiteles. Potrebovali smo še tri dodatne trakove za kontrole in enega za barvanje z barvili Comassie ali Ponceau S. Membrano smo narezali na trakove po dolžini tako, da so vsebovali celoten proteinski profil od najmanjšega do največjega proteina. Trakove smo inkubirali v skoncentriranih vzorcih protiteles. Glede na to, da je bila količina posameznih vzorcev s protitelesi zelo majhna (od približno 0,75 do 2,5 ml), smo vzorce inkubirali v inzulinkah (BD, ZDA). Pripravili smo jih tako, da smo gumijasti bat, ki se nahaja na potisnem delu inzulinke sneli s potisnega dela, ga obrnili za 180° in ga potisnili v samo inzulinko. S tem smo zatesnili del inzulinke, ki navadno dozira raztopine v injekcijsko iglo. Tako pripravljene inzulinke smo postavili pokončno v stojalo iz stiropora in tako dobili inkubacijske posodice, ki so bile ustreznih dolžin in volumnov (1 ml). Vse nadaljnje stopnje, razen zadnje, so potekale v inzulinkah. Najprej smo naredili shemo in označili vse inzulinke. Potem smo odpipetirali ustrezne vzorce v označene inzulinke. Po potrebi, če je bilo kakšnega vzorca volumsko manj kot 1 ml, smo do vrha dolili PBS. To smo naredili, da se je cel trak membrane izpostavil vzorcu v inzulinki in morebitnim reakcijam, ki so potekale v raztopini. Inkubirali smo pri sobni temperaturi 1 uro. Po inkubaciji smo vzorce preprosto odlili nazaj v ustrezne epice in jih shranili v hladilniku za morebitno ponovno uporabo. Trakove membran smo spirali trikrat po 10 minut v 0,05 % Tween v PBS. Membrano smo nato inkubirali 1 uro v konjugiranih kozjih protitelesih proti mišjim IgG (Sigma, A9917). Kozja protitelesa so bila redčena v razmerju 1:1500 v PBS.

Raztopine sekundarnih protiteles smo nato odlili. Sledila je faza spiranja odvečnih oz. slabo vezanih sekundarnih protiteles. Spirali smo dvakrat po 10 minut v 0,05 % Tween v PBS in nato še enkrat po 10 minut v PBS. Potem smo si pripravili čisto stekleno ravno podlago in s pinceto vzeli trakove iz inzulink. Položili smo jih na stekleno površino tako, da se niso stikali skupaj. Prelili smo jih s toliko barvila True Blue (Kirkegaard & Perry Laboratories, ZDA), da se barvila posameznih trakov niso prelivala z enega na drugega. Počakali smo na barvne reakcije in po ustreznji stopnji obarvanja pozitivne kontrole reakcijo prekinili. To smo storili tako, da smo posamezne trakove potopili v posodo z deionizirano vodo. Rezultate smo skrbno in natančno prilepili na prazen list papirja in jih poskenirali.

3.8 SHEMA POSKUSA



Slika 5: Shematski prikaz zaporedja vseh testov

4 REZULTATI

4.1 SELEKCIJA HIBRIDOMOV

Hibridome, ki so zrasli na plošči s 96 luknjami, smo testirali s testom ELISA. Ugotavljalci smo, kateri hibridomi v gojišče izločajo specifična protitelesa. Rezultati testa ELISA so prikazani v preglednici 7.

Preglednica 7: Rezultati testa ELISA in testa Imunoblot – IBL (preliminarno testiranje hibridomov)

Hibridom	1D2	1B4 ^b	1G9	1H6	1A3	2B2 ^b	2B12	2C6 ^b	2D11
ELISA	0,105	0,140	0,119	0,116	0,101	0,100	0,170	0,137	0,101
IBL:prot [kDa]	ND	12	ND	ND	ND	/	12	12; 37	ND
Hibridom	2F2	2G11	2G12	3A4	3D6	3G2	3H1	3H2 ^a	3H9
ELISA	0,122	0,135	0,099	0,151	0,122	0,131	0,109	0,127	0,101
IBL:prot [kDa]	ND	/	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hibridom	4A1	4A11	4D3	4D4 ^b	4G4	4H8	5B5 ^a	5C6	5H2 ^b
ELISA	0,106	0,117	0,163	0,180	0,191	0,106	0,102	0,135	0,111
IBL:prot [kDa]	ND	ND	/	12	ND	ND	ND	12	12;37;43; 60; 90
Hibridom	7B9	7B11	7E7 ^b	7F4	7F5	7F9	8A12	8B1	8B6 ^b
ELISA	0,125	0,132	0,193	0,101	0,184	0,106	0,112	0,136	0,135
IBL:prot [kDa]	ND	ND	12; 33	ND	ND	ND	ND	ND	65
Hibridom	8B8	8D11 ^b	8F12 ^b	8G7	8H8	8H12			
ELISA	0,116	0,180	0,119	0,137	0,103	0,139			
IBL:prot [kDa]	ND	12	12	ND	ND	ND			

Opombe:

a – hibridomi so bili tekom gojenja okuženi z bakterijami (in izločeni iz testov)

b – hibridomi, ki smo jih s tehniko končnega redčenja nadalje uporabili za pridobitev čistih klonov

ND – testiranja niso bila opravljena

/ – ni reakcije

Številčne vrednosti testa ELISA v preglednici so vrednosti izmerjene absorbance pri 405 nm.

V preglednici 7 so vpisane absorbance testa ELISA, izmerjene pri 405 nm valovne dolžine svetlobe. Višja absorbanca pomeni večji titer specifičnih protiteles. Pri nadaljnji selekciji smo si pomagali tudi z rezultati imunskega pivnanja (Western blot – imunoblot). To so podatki o molekulskih masah proteinov na katera so se vezala protitelesa. Izveden je bil tudi posredni imunoperoksidazni test (IIPA). Supernatanti hibridomov 2C6, 5C6, 5H2 in 8B6 so reagirali z nativnimi kolonijami *M. cynos* (sev 896).

4.2 SELEKCIJA HIBRIDOMSKIH KLONOV PO VEČ KRITERIJIH

4.2.1 Primarna selekcija klonov s testom ELISA

Hibridomi, ki so izločali veliko protiteles proti *M. cynos* v testu ELISA (preglednica 7), so nosili naslednje oznake: 1B4, 2B2, 2C6, 4D4, 5H2, 7E7, 8B6, 8D11, 8F12. Slednje smo uporabili nadalje za selekcijo klonov. Kloni so bili, preden je bil poskus predan v moje roke, klonirani in selezionirani iz 6 hibridomov z oznakami 1B4, 2B2, 4D4, 8B6, 8D11 in 8F12 (preglednica 8).

Preglednica 8: Test ELISA preliminarno kloniranih hibridomov

Klon		1B4D8	2B2A5	4D4C3	8B6F7	8D11G6	8F12D6	8F12G4
ELISA	DMEM	0,025	0,027	0,022	0,023	0,025	0,027	0,101
	SFM	0,041	0,067	0,021	0,060	0,024	0,028	0,081

Klon		8F12G10	S	D	+
ELISA	DMEM	0,095	0,023	0,025	0,241
	SFM	0,085			

Opombe:

DMEM – kloni so bili gojeni v gojišču DMEM, 10 % FBS

SFM – kloni so bili gojeni v gojišču SFM

V zadnjih treh stolpcih so rezultati meritev kontrol. + predstavlja pozitivno kontrolo (imunski serum; redčitev 1:100), S in D pa predstavljata negativni kontroli (SFM in DMEM, 10 % FBS).

Najvišjo absorbanco pri testu ELISA preliminarno kloniranih hibridomov so pokazali 8F12G4, 8F12G10, 2B2A5, in 8B6F7. 8F12G4 in 8F12G10 sta boljše rezultate dala v mediju DMEM, 10 % FBS, 1B4D8 je dal šibke reakcije, medtem ko so kloni 4D4C3, 8D11G6 in 8F12D6 pokazali negativen rezultat v testu ELISA.

Pri selekciji klonov iz preostalih štirih hibridomov 2C6, 5H2, 7E7 in 8B6 sem sodeloval tudi sam (preglednica 3 in 4). Vsak hibridom smo po principu končnega redčenja nacepili na mikrotitrsko ploščo s 96 jamicami. Dobili smo 26 klonov iz hibridoma 2C6. Od teh je vseh 26 klonov pri testu ELISA pokazalo negativen rezultat. Iz hibridoma 8B6 smo prav tako pridobili 26 klonov. Slednji prav tako niso pokazali pozitivnih rezultatov pri testu ELISA. Pri kloniranju hibridoma 7E7 so bili rezultati obetavnejši. Dobili smo 21 klonov od katerih je eden od klonov, 7E7H3, pri testu ELISA pokazal vrednost višjo od negativnih kontrol. Najvišje število klonov smo dobili pri hibridomu 5H2, tj. 38. Pri testu ELISA je bilo negativnih samo 11 klonov. Rezultati ostalih 27 hibridomov so bili višji od rezultatov obeh negativnih kontrol. Za nadaljnje analize smo od vseh klonov 5H2, ki so bili pozitivni pri testu ELISA, izbrali dva, in sicer 5H2A7 in 5H2A1.

Preglednica 9: Test ELISA – testiranje supernatantov klonov pridobljenih iz štirih hibridomov

klon	8B6A1	8B6B1	8B6E3	8B6H10	2C6D8	2C6F11	2C6H4	7E7B10
ELISA	0,024	0,024	0,024	0,023	0,023	0,028	0,024	0,026
klon	8B6A2	8B6C12	8B6E5	8B6H12	2C6D9	2C6F12	2C6H6	7E7C1
ELISA	0,026	0,025	0,025	0,024	0,025	0,026	0,025	0,025
klon	8B6A4	8B6D2	8B6E10	2C6A3	2C6D11	2C6G1	2C6H7	7E7C5
ELISA	0,025	0,024	0,024	0,025	0,026	0,024	0,024	0,023
klon	8B6A10	8B6D3	8B6F8	2C6A4	2C6E5	2C6G7	2C6H10	7E7C8
ELISA	0,025	0,025	0,027	0,024	0,025	0,026	0,024	0,025
klon	8B6B11	8B6D4	8B6F12	2C6A9	2C6E8	2C6G8	7E7A5	7E7C11
ELISA	0,027	0,029	0,026	0,024	0,025	0,027	0,025	0,025
klon	8B6B8	8B6D7	8B6G5	2C6B4	2C6E11	2C6G9	7E7A6	7E7D5
ELISA	0,026	0,027	0,025	0,024	0,024	0,026	0,024	0,023
klon	8B6B4	8B6D12	8B6G6	2C6C3	2C6F1	2C6G10	7E7A10	7E7E3
ELISA	0,027	0,024	0,025	0,023	0,024	0,024	0,024	0,024
klon	8B6B3	8B6E2	8B6H6	2C6C6	2C6F10	2C6H3	7E7B1	7E7E10
ELISA	0,025	0,025	0,025	0,023	0,024	0,024	0,024	0,023
klon	7E7F1	7E7H9	5H2A10	5H2C6	5H2E5	5H2G2	5H2G10	
ELISA	0,024	0,035	0,018	0,034	0,026	0,034	0,028	
klon	7E7F2	7E7H10	5H2A12	5H2C9	5H2E7	5H2G3	5H2H1 ^a	
ELISA	0,036	0,036	0,033	0,034	0,035	0,023	0,037 ^a	
klon	7E7F7	5H2A1	5H2B4	5H2D2	5H2E8	5H2G4	5H2H8	
ELISA	0,024	0,035	0,036	0,033	0,036	0,022	0,023	
klon	7E7F12	5H2A3	5H2B5	5H2D3	5H2E10	5H2G6	5H2H12	
ELISA	0,033	0,027	0,036	0,037	0,033	0,022	0,033	
klon	7E7H3 ^a	5H2A4	5H2B6	5H2D11	5H2F6	5H2G7	Poz. kon.	
ELISA	0,037 ^a	0,035	0,025	0,036	0,032	0,033	0,241	
klon	7E7H5	5H2A7 ^a	5H2C1	5H2E1	5H2F9	5H2G8	SFM*	
ELISA	0,024	0,038 ^a	0,035	0,026	0,032	0,035	0,023	
klon	7E7H8	5H2A9	5H2C2	5H2E3	5H2G1	5H2G9	DMEM*	
ELISA	0,032	0,026	0,036	0,025	0,022	0,034	0,025	

Opombe:

Poz. kon – pozitivna kontrola (imunski serum, redčitev 1: 100)

SFM*, DMEM* – sveži gojišči uporabljeni kot negativni kontroli

^a – oznake klonov, ki so pokazali nizko pozitivne rezultate pri testu ELISA

Številčne vrednosti testa ELISA v preglednici so vrednosti izmerjene absorbance pri 405 nm.

4.2.2 Karakterizacija klonov glede na rast

Preglednica 10: Dinamika rasti klonov v dveh različnih gojiščih

Klon (oznaka)	1B4D8	2B2A5	2C6F11	2C6G8	4D4C3	5H2A7	5H2D3	5H2G8	5H2H1	
Rast v SFM	++	+++	ND	+++	++	++	ND	ND	++	
Rast v DMEM, 10% FBS	+	++	+	+	+	++	+	+	++	
Klon (oznaka)	7E7F2	7E7H3	7E7H10	8B6B4	8B6D4	8B6F7	8B6F8	8D11G6	8F12D6	
Rast v SFM	ND	++	ND	ND	ND	+++	ND	+++	++	
Rast v DMEM, 10 % FBS	+	+	+	+++	++	++	+++	+	+	
Klon (oznaka)	8F12G4	8F12G10								
Rast v SFM	++	++								
Rast v DMEM, 10 % FBS	+	++								

Opombe:

+++ – zelo hitra rast ++ – hitra rast

+ – počasna rast ND – hitrost rasti ni bila določena

Hibridome smo pred selekcijo klonov gojili v DMEM, 10 % FBS z 0,1 % (v/v) gentamicina. Odločili smo se testirati uspešnost rasti v mediju SFM z 0,1 % gentamicina. Rezultati hitrosti rasti so prikazani v preglednici 3. Hitrost rasti smo ocenili z invertnim mikroskopom glede na število celic v vidnem polju (Olympus, CK2). Rezultate smo razvrstili glede na hitrost rasti, in sicer z +++, ++ oz. +, pri čemer +++ predstavlja največjo hitrost rasti. Hitrosti rasti smo lahko potrdili tudi glede na količino sedimentiranih celic po centrifugiranju (pri presajanju celic). Po centrifugiranju smo centrifugirke postavili v vrsto na stojalo in primerjali višino sedimenta posameznih klonov. Seveda smo pri tem upoštevali morebitne redčitve pri presajanju.

Pri tem poskusu smo prišli do zanimive ugotovitve, da so celice, ki smo jih gojili v mediju SFM, rasle bolje ali enako hitro kot v DMEM, 10 % FBS. V DMEM, 10 % FBS sta zelo hitro rasla klena 8B6B4 in 8B6F8. Slednja nista bila testirana ali rasteta v mediju SFM. Kloni 2B2A5, 8B6F7, 8B6D4, 8F12G10, 5H2H1 in 5H2A7 so hitro rasli v DMEM, 10 % FBS. Ostali kloni so počasi rasli v DMEM, 10 % FBS. V gojišču SFM so zelo hitro rasli 2B2A5, 8B6F7, 8D11G6 in 2C6G8. Rast 8B6B4, 8B6F8, 8B6D4, 7E7F2 in 2C6F11 ni bila definirana. Ostali kloni so v mediju SFM rasli hitro. Pri vizualnem določanju hitrosti rasti smo, po količini peleta v centrifugirkah po centrifugiranju, dobili enake rezultate.

4.2.3 Selekcija klonov glede na njihovo produktivnost monoklonskih protiteles

Preglednica 11: Rezultati testa ELISA supenatantov klonov gojenih v DMEM, 10 % FBS in v mediju SFM po koncentriranju in čiščenju z dializnim postopkom

Klon		1B4D8	2B2A5	2C6G8	4D4C3	5H2A7	7E7H3	8B6B4
ELISA3	D	ND	ND	0,018	0,033	0,040	0,036	0,032
	S	ND	ND	0,074	0,032	0,074	0,100	0,031
Klon		8B6D4	8D11G6	8F12G4	8F12G10	A	B	C
ELISA3	D	0,034	0,032	0,033	0,029	0,028	0,025	0,227
	S	0,054	0,139	0,092	0,092			
E								

Opombe:

D – kloni gojeni v DMEM, 10 % FBS

S – kloni gojeni v SFM

A – SFM (negativna kontrola)

B – DMEM, 10 % FBS (negativna kontrola)

C – mišji imunski serum (pozitivna kontrola, redčitev 1:400)

E – 1x PBS

ND – test ni bil izveden

Številčne vrednosti v preglednici so vrednosti izmerjene absorbance pri 405nm.

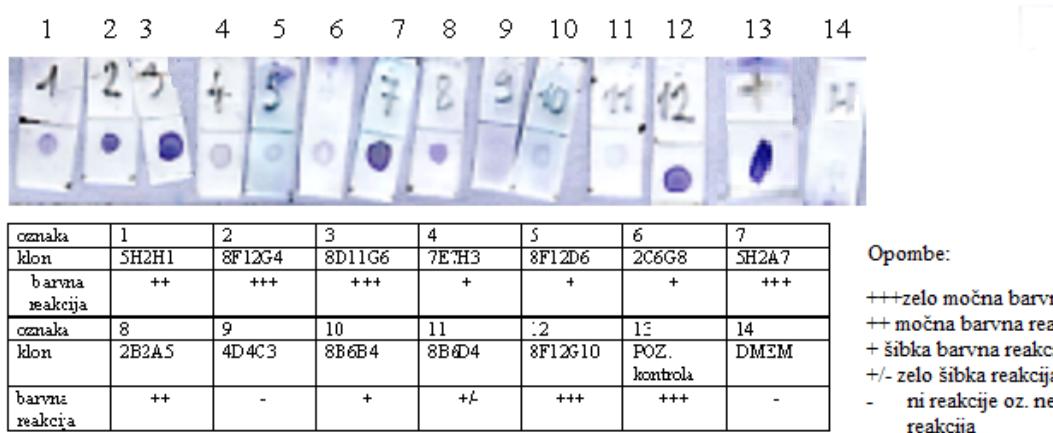
Klone smo gojili v velikih gojitvenih posodah, v katerih je bilo 30 ml gojišča. Supernatante gojišč smo zbrali trikrat. Od vsakega klena smo zbrali po 90 ml supernatanta gojišča. Po koncentriranju in dializi smo dobili 1–2 ml koncentrirane raztopine, v kateri naj bi bila skoncentrirana protitelesa. Po koncentriranju in čiščenju monoklonskih protiteles so bili rezultati absorbanc pri testu ELISA v povprečju višji kot prej, kar je prikazano v preglednici 11. Rezultati testa ELISA supenatantov klonov, ki imajo absorbanco višjo kot negativne kontrole, se opazno razlikujejo glede na medij v katerem so rasli. V mediju SFM je produkcija protiteles večja. V DMEM, 10 % FBS pa produkcija protiteles ne poteka. Klona 4D4C3 in 8B6B4 imata zelo šibko pozitivne rezultate pri testu ELISA. Hibridoma 2B2A5 in 1B4D8 smo zaradi težav pri gojenju iz tega testa izpustili.

4.2.4 Selekcija hibridomskih klonov glede na test DIBA

4.2.4.1 Encimsko imunski test (DIBA za dokazovanje mišjih IgG)

Pri testu DIBA smo ugotavljali kateri supernatanti klonov proizvajajo mišje IgG. Njihova specifičnost v tem testu ni predmet raziskave. Trakovi membran so bili sestavljeni iz dveh delov. Zgornji del je bil namenjen označevanju in manipuliraju membrane s pinceto, spodnji je služil za samo testiranje, kot je razvidno iz slike 6. Vsi hibridomski kloni, razen tistih pod zaporedno številko 9, so proizvajali mišje IgG. Klon 4D4C3 torej ni proizvajal

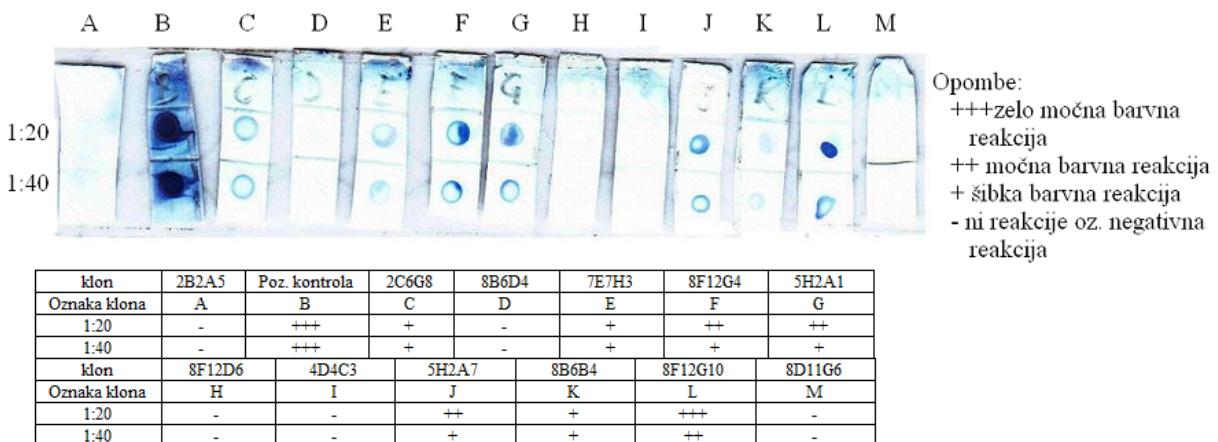
protiteles, saj ni prišlo do barvne reakcije. Kloni 8F12G4, 8D11G6, 5H2A7, 8F12G10 so proizvajali velike koncentracije protiteles, saj je prišlo do močnega obarvanja, ki smo ga označili s tremi plusi (+++). Prav tako je prišlo do močne barvne reakcije pri pozitivni kontroli, tj. mišjem serumu. Pri klonu 8B6D4 ni čisto jasno ali proizvaja protitelesa ali ne, saj je bila barvna reakcija zelo šibka.



Slika 6: Test DIBA za dokazovanje mišjih IgG. Nosilec membrana PVDF (Millipore, velikost por 0,45 µm); Antigen: 3 µL supernatanta gojišča posameznega klena; pozitivna kontrola je mišji imunski serum (redčitev 1:100); protitelesa: kozji IgG (proti mišjim IgG) s hrenovo peroksidazo (redčitev 1:1500, Sigma, A9917); barvilo: True Blue (Kirkegaard & Perry Laboratories, ZDA).

4.2.4.2 Encimsko imunski test (DIBA za dokazovanje specifičnih protiteles)

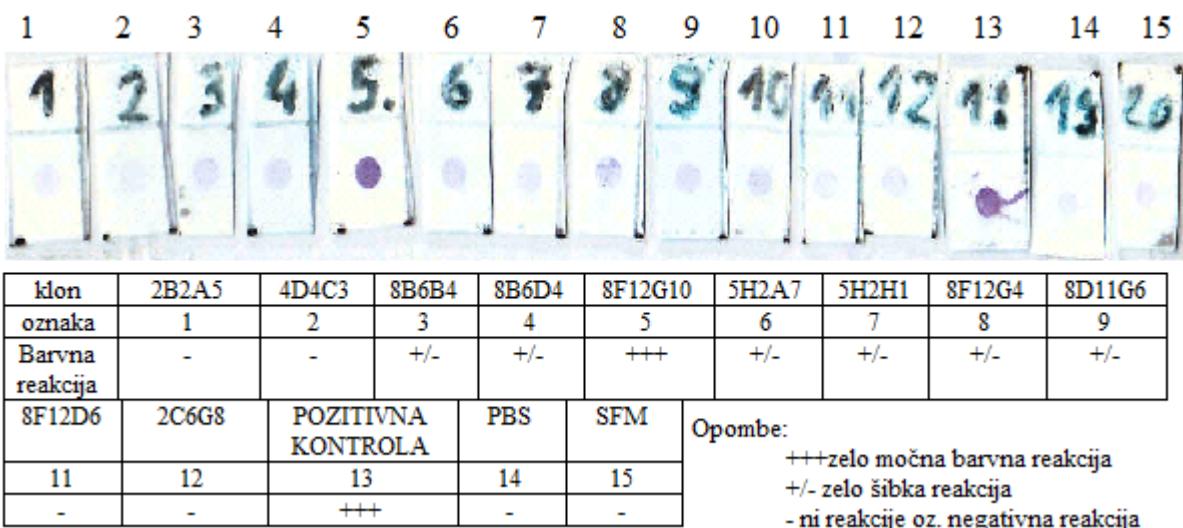
S testom DIBA smo ugotavljali prisotnost specifičnih protiteles. Posamezni trakovi so bili sestavljeni iz treh predelkov. Prvi, zgornji del, je bil namenjen označevanju posameznega traka, spodnja dva dela pa sta bila namenjena analizi različnih redčin antiga *M. cynos* (1:20 in 1:40), kot je prikazano na sliki 7. Kloni 2B2A5, 8B6D4, 8F12D6, 4D4C3 in 8D11G6 niso proizvajali specifičnih protiteles, saj ni prišlo do obarvanja. Kloni 7E7H3, 8B6B4 in 2C6G8 so proizvajali nizke koncentracije protiteles, saj je prišlo do šibke barvne reakcije. Do močne barvne reakcije je prišlo pri klonih 5H2A7, 8F12G4, 5H2A1 z redčitvijo antiga 1:20 in pri klonu 8F12G10 pri redčitvi antiga 1:40. Do zelo močne barvne reakcije je prišlo v primeru obeh redčitev pri pozitivni kontroli in pri klonu z redčitvijo antiga 1:20 pri 8F12G10. Pri pozitivni kontroli se je zaradi močne barvne reakcije cela membrana obarvala modro. To bi lahko preprečili, če bi trak membrane s pozitivno kontrolo pravočasno potopili v deionizirano vodo. Testa DIBA smo izvajali vzporedno.



Slika 7: Test DIBA za dokazovanje specifičnih protiteles. Nosilec membrana PVDF (Millipore, velikost por 0,45 µm); Antigen: 3 µl antigaena *M. cynos* (v dveh redčitvah, kot označeno na sliki 1:20 in 1:40); vzorci so bili supernatanti hibridomov, pozitivna kontrola je mišji imunski serum (redčitev 1:100); sekundarna protitelesa so bila kozji IgG (proti mišjim IgG) konjugirani s hrenovo peroksidazo (redčitev 1:1500, Sigma, A9917); barvilo: True blue (Kirkegaard & Perry Laboratories, ZDA).

4.2.5 Selekcija klonov glede na ohranjanje sposobnosti sinteze specifičnih monoklonskih protiteles

Namen nadaljnega presajanja je bil ugotoviti, kateri kloni skozi daljše obdobje presajanja ohranijo sposobnosti biosinteze monoklonskih protiteles. Zelo močna barvna reakcija se je razvila pri pozitivni kontroli in pri klonu 8F12G10. Zelo šibke barvne reakcije so se razvile pri 5H2H1, 5H2A7, 8D11G6, 7E7H3, 8B6B4, 8B6D4, 8F12G4. Pri klonih 2B2A5, 2C6G8, 4D4C3 in 8F12D6 ni bilo barvne reakcije oz. je ta bila negativna. Prav tako barvne reakcije ni bilo pri obeh negativnih kontrolah, tj. PBS in SFM (slika 8).

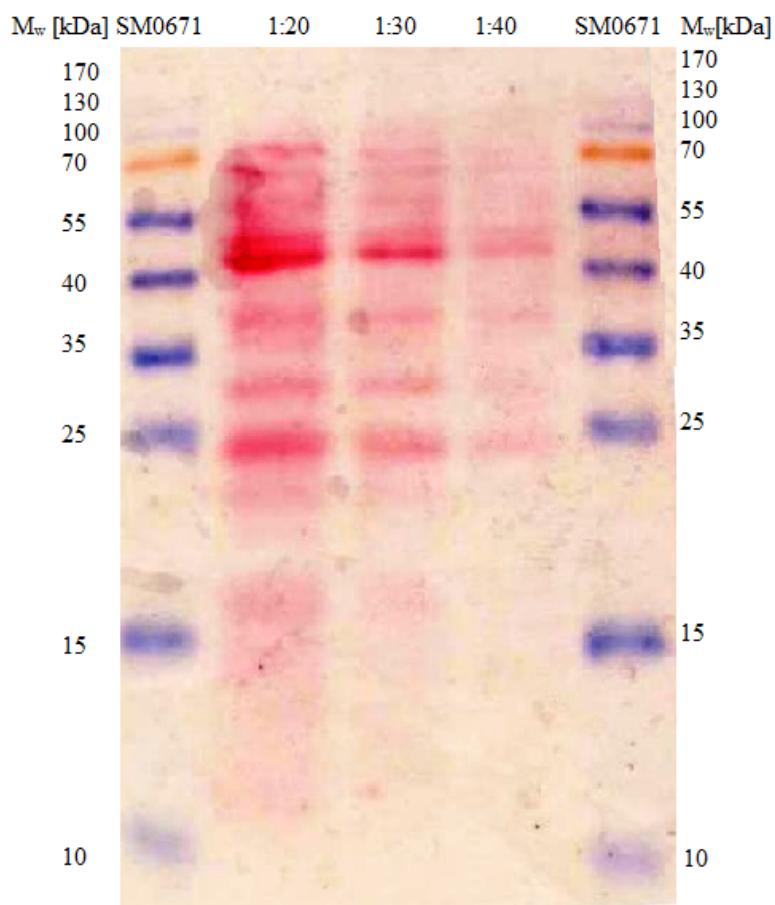


Slika 8: Posredni imunski test DIBA (dokaz stabilnosti klonov). Nosilec membrana PVDF (Millipore, velikost por 0,45 µm); Antigen: V = 3 µl antigaena *M. cynos* (redčitev 1:30); vzorci so bili supernatanti hibridomov po dializi; pozitivna kontrola je mišji imunski serum (redčitev 1:100); protitelesa so bila kozji

IgG (proti mišjim IgG) konjugirani s hrenovo peroksidazo (redčitev 1:1500, Sigma, A9917); barvilo: True blue (Kirkegaard & Perry Laboratories, ZDA).

4.3 OPTIMALNA KONCENTRACIJA VZORCA ANTIGENA *M. cynos* ZA PRENOS NA MEMBRANO

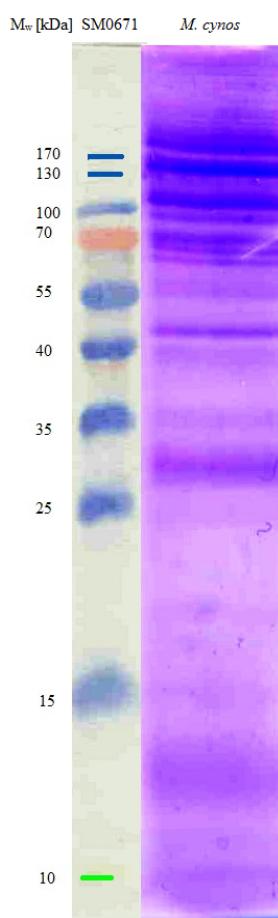
Pripravili smo poliakrilamidni gel s 15 % ločevalnim gelom in 5 % koncentracijskim gelom. Na sliki 9 vidimo tri različne redčitve antigena *M. cynos*. Robna stolpca lis predstavljata referenčni marker SM0671. Velikosti posameznih lis referenčnih markerjev (kDa) so napisane na desni in levi strani slike 9. Na sliki lahko opazimo različne redčitve antigena *M. cynos* (1:20, 1:30 in 1:40) tudi zaradi različnih stopenj obarvanja z barvilom Ponceau S. Membrano smo preveč razbarvali, saj so se lise manjših proteinov pri redčitvi 1:40 razbarvale. Po premisleku smo se odločili in ugotovili, da bomo za nadaljnje teste (elektroforeza SDS-PAGE) uporabljali redčitev antigena *M. cynos* 1:30. Redčitev 1:40 bi bila preveč razredčena in ne bi dala ustreznih rezultatov. Redčitev 1:20 bi bila preveč koncentrirana in lahko bi prišlo do premočnih obarvanj.



Slika 9: Ugotavljanje optimalne koncentracije antigena *M. cynos* za prenos na membrano. Redčitve antigena so 1:20, 1:30, 1:40; M_w : molekulska masa v kilo daltonih; SM0671: tribarvni referenčni marker.

4.4 PROFIL PROTEINOV *M. cynos*

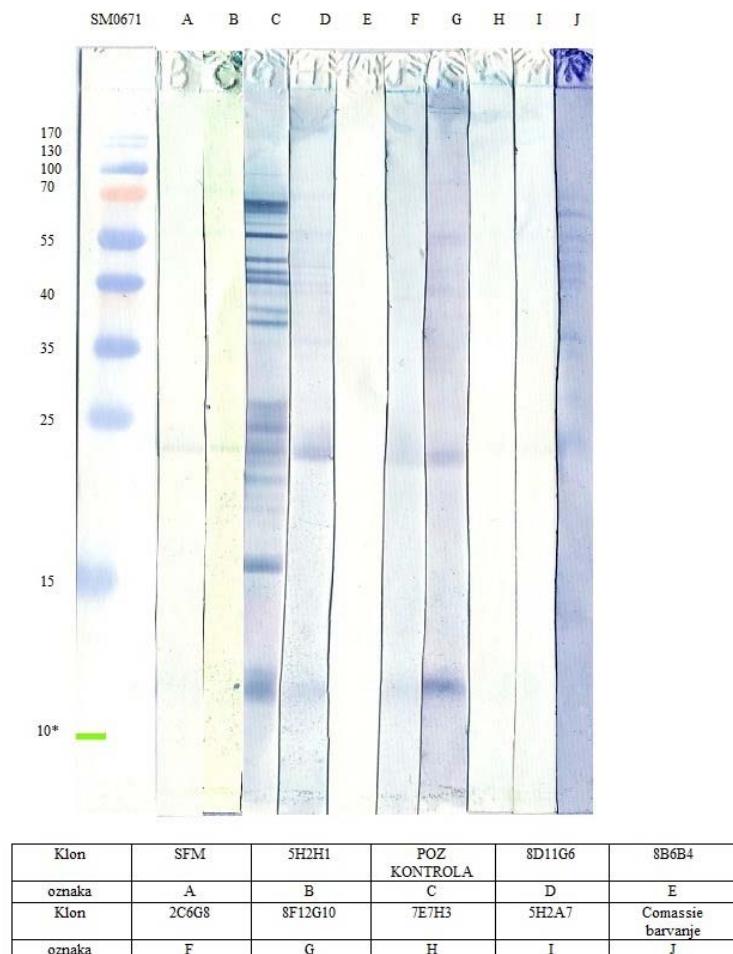
Gel smo po elektroforezi SDS-PAGE barvali z barvilom Coomassie blue. Gel smo prav tako barvali po prenosu na membrano in z barvanjem preverili uspešnost prenosa proteinov nanjo. Na levi strani slike 10 je prikazan referenčni marker SM0671 po prenosu na membrano. Molekulske mase proteinov *M. cynos* pred prenosom na membrano (na gelu) so prikazane na sliki 10. Gibljejo se okoli (po molekulskih masah naraščajoče): 10, 12, 15, 19, 24, 30, 35, 40, 45, 55, 60, 65, 67, 70, 90, 95, 100, 110, 135, 190 kDa. Pri večjih proteinih so odstopanja v ocenitvi molekulskih mas večja. Robovi lis so nejasni. Prav tako je na sliki razvidna ukrivljenost profilov, ker je proteinski profil izrezan iz robnega kosa gela. Na sliki 10 so dodane referenčne lise za 10, 130 in 170 kDa.



Slika 10: Proteinski profil proteinov *M. cynos* po elektroforezi SDS-PAGE (barvanje z barvilom Coomassie blue). Levo na sliki je marker SM0671 in desno proteinski profil membranskih proteinov. Markerji po molski masi od zgoraj navzdol: 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 in 10 kDa. Dodani so referenčni markerji za 10, 130 in 170 kDa.

4.5 REAKCIJE MONOKLONSKIH PROTITELES S PROTEINI *M. cynos*

Monoklonska protitelesa so po specifičnem barvanju proteinskega profila dala sledeče rezultate (slika 11). Levo na sliki je referenčni marker SM0671. V preglednici pod sliko 11 je prikazano, kateri preiskovani supernatant določenega klena je bil testiran na posameznem membranskem traku. Na traku označenem s C je bila testirana pozitivna kontrola, mišji imunski serum. Miška Balb/c je razvila protitelesa proti vsaj 17 proteinom, kar je vidno na traku membrane označenem s C. Protitelesa so reagirala s proteini *M. cynos* molekulskih mas: 12, 16, 22, 23, 24, 25, 27, 37, 38, 40, 45, 49, 55, 60, 65, 67, 95 kDa. S proteinoma molekulskih mas 12 in 24 kDa so reagirala specifična monoklonska protitelesa, ki so bila proizvod klonov 8D11G6, 2C6G8 in 8F12G10 (pod oznakami D, F in G na sliki 11). Vsi ostali testirani vzorci (5H2H1, 8B6B4, 7E7H3 in 5H2A7) niso vsebovali specifičnih protiteles proti proteinom *M. cynos*. Pod oznako J je na sliki robni del membrane obarvan z barvilkom Coomassie. Obarvanja potrjujejo uspešen prenos proteinov na membrano.



Slika 11: Reakcije proteinov *M. cynos* (896) pri analizi imunoblot. Reakcije monoklonskih protiteles so vidne na trakovih C, D, F, G in J. Trak A je SFM (negativna kontrola), trak C pa imunski mišji serum (pozitivna kontrola). Trak J je robni trak membrane po prenosu proteinov barvane z bravilom Coomassie blue. Referenčni marker 10* (10 kDa) je dodan v programu Slikar. Njegov položaj je bil določen na podlagi lis referenčnega standarda v gelu enake zamreženosti (priloga A).

Preglednica 12: Celoten pregled rezultatov testiranj supernatantov hibridomov

Hibridomi in kontrole	Preliminarna ELISA	Hibridomi (KLONI)	Hitrost rasti hibridomov		ELISA		ELISA (po koncentriranju)		DIBA za dokazovanje mišjih IgG	DIBA za dokazovanje specifičnih IgG	Stabilnost klonov	Reakcije s topnimi proteini <i>M. cynos</i> (896)
			SFM	DMEM	SFM	DMEM	SFM	DMEM				
1B4	0,140	1B4D8	++	+	0,041	0,024	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2B2	0,100	2B2A5	+++	++	0,067	0,027	ND	ND	++	-	-	ND
2C6	0,137	2C6F11	ND	+	/	0,028	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		2C6G8	+++	+	/	0,027	0,074	0,018	+	+	-	-
4D4	0,180	4D4C3	++	+	0,021	0,022	0,032	0,033	-	-	-	ND
5H2	0,111	5H2A7	++	++	/	0,038	0,074	0,040	+++	++	+/-	-
		5H2D3	ND	+	/	0,037	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		5H2G8	ND	+	/	0,035	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		5H2H1	++	++	/	0,037	ND	ND	++	++	+/-	-
7E7	0,193	7E7F2	ND	+	/	0,036	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		7E7H3	++	+	/	0,037	0,100	0,036	+	+	ND	-
		7E7H10	ND	+	/	0,036	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8B6	0,135	8B6B4	ND	+++	/	0,027	0,031	0,032	+	+	+/-	-
		8B6D4	ND	++	/	0,029	0,054	0,034	+	-	+/-	ND
		8B6D7	+++	++	0,60	0,023	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		8B6F8	ND	+++	/	0,027	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8D11	0,180	8D11G6	+++	+	0,024	0,025	0,139	0,032	+++	-	+/-	12 in 24 kDa
8F12	0,119	8F12D6	++	+	0,028	0,027	ND	ND	+	-	ND	ND
		8F12G4	++	+	0,081	0,101	0,092	0,033	+++	++	+/-	ND
		8F12G10	++	++	0,085	0,095	0,092	0,029	+++	+++	+++	12 in 24 kDa
SFM	/	/	/	/	0,023		0,028		/	/	-	-
DMEM	/	/	/	/	0,025		0,025		-	-	/	ND
m. serum	/	/	/	/	0,241		0,227		+++	+++	+++	*
PBS	/	/	/	/	/		0,036		/	/	-	ND

*: Mišji serum (m. serum) reagira s 15 topnimi proteini različnih molekulskih mas: 12, 16, 22, 23, 24, 25, 27, 37, 38, 40, 45, 49, 55, 60, 65, 67, 95 kDa.

DMEM: gojišče DMEM, 10 % FBS

SFM: gojišče brez seruma

PBS: fosfatni bufer; ND: analiza ni izvedena

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Mycoplasma cynos je pri psih prisotna kot del normalne flore, lahko pa povzroča resnejše bolezni kot primarni povzročitelj ali kot eden izmed patogenih mikroorganizmov pri okužbah. Hiter tempo življenja in človeška malomarnost sta povod za ustanovitev vse več pasjih dnevnih centrov in zavetišč. Vsak epidemiolog ve, da gostejša populacija poveča možnosti za nastanek epidemij in tudi razvoja novih bolezni.

K raziskavi sem se priključil na stopnji selekcije hibridomov. Imunizacije, fuzija primarne in trajne celične linije so bile predhodno opravljene. Metode in materiali za slednje korake so opisani v priročniku »Imunske Tehnologije« (Narat, 2004). Vzorce s proteini *M. cynos* sproščenih s celic je pripravil dr. Benčina.

Na začetku testiranja smo imeli 42 hibridomov. Testirali smo jih, ali proizvajajo specifična protitelesa proti *M. cynos*. S posrednim testom ELISA smo dokazali, da sintetizirajo protitelesa proti *M. cynos*. Na podlagi reakcij proteinov v testih imunoblot (preglednica 7), smo izbrali osem hibridomov za kloniranje. To so bili kloni z oznakami: 1B4, 2B2, 2C6, 4D4, 5H2, 7E7, 8B6, 8D11, 8F12. Iz preglednice 7 je razvidno, da so nekateri hibridomi primarno sintetizirali različna protitelesa, saj so supernatanti v imunoblotih reagirali z več lisami proteinov. Ti hibridomi so bili 2C6, 5H2 in 7E7. 2C6 je reagiral s proteinoma molekulskih mas 12 in 37 kDa, 5H2 je reagiral s proteini 12, 37, 43, 60 in 90 kDa, klon 7E7 pa je reagiral s proteinoma molekulskih mas 12 in 33 kDa. Predhodno je bilo kloniranih in seleкционiranih šest klonov: 1B4, 2B2, 4D4, 8B6, 8D11 in 8F12. Ostale štiri hibridome smo klonirali in iz hibridoma 2C6 pridobili 26 klonov, prav toliko smo jih dobili iz hibridoma 8B6, iz 7E7 smo jih dobili 21 in iz 5H2 38 klonov. Vsi so pri testu ELISA pokazali precej nižje vrednosti absorbanc kot predhodni neklonirani hibridomi (preglednice 7, 8, 9). Najvišja vrednost absorbance pri testu ELISA je bila 0,101, in sicer pri klonu 8F12G4. Pozitivna kontrola (mišji serum 1:100) je pokazala absorbanco 0,241. Absorbance testa ELISA so nekoliko nizke. Glede na to, da je povprečje absorbanc negativnih kontrol (DMEM in PBS) 0,024, bi pričakoval nekoliko višje rezultate pri testu ELISA. Kloni, ki smo jih uporabili za nadaljnja testiranja so bili: 1B4D8, 2B2A5, 4D4C3, 8B6F7, 8D11G6, 8F12D6, 8F12G4, 8F12G10, 7E7H3, 5H2A7 in 5H2H1, njihove pripadajoče absorbance pri testu ELISA po vrsti so: 0,025, 0,027, 0,022, 0,023, 0,025, 0,027, 0,101, 0,038, 0,037 in 0,037. Poudariti je potrebno naslednje. Pri prvem testu ELISA (preglednica 7) so bile kot antigen uporabljene celice *M. cynos*. Pri vseh nadaljnjih testih ELISA pa so bili uporabljeni vzorci »topnih« proteinov *M. cynos*, ki jih je pripravil dr. Benčina. Ker je teh proteinov manj, v nekaterih primerih ni prišlo do reakcij pri testu ELISA oz. so te bile šibkejše. Hibridomi 2C6, 5C6, 5H2 in 8B6 so v posrednem imunoperoksidaznem testu (IIPA) (Polak-Vogelzang in sod, 1978; Benčina in Bradbury,

1991) reagirali z nativnimi kolonijami *M. cynos* (896). To pomeni, da se ti proteini nahajajo na površini ali v membrani celic *M. cynos* (12 in 65 kDa).

Ker smo nekatere klone vzporedno že gojili v mediju SFM, smo se odločili, da testiramo, kateri od gojitevnih medijev je boljši za rast hibridomov. Ko smo presadili klone iz mikrotiterskih plošč v gojitvene posode, smo v dveh različnih gojiščih ugotavljali hitrost njihove rasti. Ugotovili smo, da hibridomi rastejo bolje ali enako hitro v mediju SFM kot v gojišču DMEM, 10 % FBS (preglednica 10).

Ugotavljali smo tudi, kateri hibridomi proizvajajo specifična in kateri nespecifična protitelesa (slika 6 in 7). Na sliki 6 je iz testa DIBA lepo razvidno, da supernatanta klonov 4D4C3 in 8B6D4 ne reagirata in tako ne proizvajata IgG, medtem ko ostali proizvajajo IgG. Da smo potrdili, katera izmed njih so specifična, smo morali rezultate testa DIBA za dokaz specifičnih protiteles primerjati z rezultati testa DIBA na mišje IgG. Iz slike 7 je razvidno, da šest klonov ne proizvaja specifičnih protiteles, ki bi reagirali s proteini *M. cynos*. To so kloni 2B2A5, 8B6D4, 7E7H3, 8F12D6, 4D4C3 in 8D11G6. Supernatanta klonov 4D4C3 in 8B6D4 na testu DIBA nista dala pozitivne reakcije, kar pomeni, da nista proizvajala IgG. Supernatanti klonov 2B2A5, 8F12D6, 7E7H3 in 8D11G6, ki so pokazali barvno reakcijo na testu DIBA na mišje IgG, reakcije pa ni bilo prisotne na testu DIBA za dokaz specifičnih protiteles, niso proizvajali specifičnih protiteles, proizvajali pa so nespecifična. Razlog za to je najverjetnejše prav v tem, da smo v kasnejših testiranjih (v primerjavi s predhodnimi) zmanjšali nabor proteinov za reakcije s supernatanti hibridomov. Uporabljali smo samo topne proteine *M. cynos* in ne vseh proteinov iz celic *M. cynos*! Supernatanti klonov 2C6G8, 8F12G4, 5H2H1, 5H2A7, 8B6B4 in 8F12G10 so izzvali barvno reakcijo pri obeh testih DIBA, kar pomeni, da so proizvedli specifična protitelesa proti topnim proteinom *M. cynos*.

Glede na dejstvo, da smo s hibridomi opravili kar visoko število presajanj (preko 20), smo se odločili, da jih presajamo naprej in tako ugotovimo stabilnost posameznih hibridomov pri ohranjanju produkcije monoklonskih protiteles. Po opravljeni 25. presaditvi smo iz treh presaditev zbrali supernatante in jih nato testirali na specifična monoklonska protitelesa. Rezultat je bil zanimiv in precej nepričakovani. Prikazan je na sliki 8. Od vseh klonov je na testu DIBA pozitivno reakcijo poleg pozitivne kontrole pokazal samo klon 8F12G10. Glede na to, da klona 8F12G10 in 8F12G4 izhajata iz enega hibridoma, lahko sklepamo, da je klon 8F12G10 zelo stabilen. Ostali kloni kažejo zelo šibko reakcijo, kar nam pove, da so imunoglobulini nizkih afinitet ali v zelo nizkih koncentracijah. V primeru klonov 2B2A5, 4D4C3, 8F12D6 in 2C6G8 do barvnih reakcij sploh ni prišlo, kar pomeni, da se je sinteza specifičnih protiteles ustavila. Zmanjšanje produkcije protiteles v mediju SFM je bilo pri daljšem gojenju ugotovljeno že prej (Ozturk in Øpalsson, 2009). Vzrok za to leži v nestabilnosti heterokariontih celic. Na začetku, ko se zlijeta celica B in mielomska celica

ima celica dve jedri, ki se združita. Zaradi nestabilnosti take celice prihaja do izgubljanja kromosomov in posledično lahko pride do nezmožnosti sinteze protiteles (Vozelj, 2000).

V primeru, da je produkcija protiteles nizka, se uporablja tehnike za koncentriranje protiteles. Za ta korak smo se odločili zaradi nizkih rezultatov absorbanc pri testu ELISA. Obarjali smo jih z amonijevim sulfatom. Postopek temelji na principu izločanja proteinov (obarjanja) v prisotnosti soli. Za uspešnoobarjanje mišjih imunoglobulinov so potrebne 45 do 50 % nasičene raztopine amonijevega sulfata (Harlow in Lane, 1988). Potem, ko smo protitelesa skoncentrirali, smo izvedli še dializo, da smo znižali koncentracije amonijevega sulfata v vzorcih. Proteine, ki so bili manjši od 12 kDa, smo v veliki večini izgubili, saj so prešli skozi dializno membrano. Vemo pa, da so immunoglobulini veliko večji proteini, 150 kDa (Roberts-Thomson in Shepherd, 1990), in tako ne morejo prehajati skozi to membrano. Po dializi smo dobili različne volumne raztopin skoncentriranih protiteles, kar je posledica vsebnosti različnih proteinov in različnih koncentracij le-teh. Velike proteinske molekule imajo večje število pozitivnih in negativnih nabojev, ki se različno hidratizirajo. Hidratacija je torej odvisna od aminokislinske sestave proteinov. Tako je posledično več vode prešlo skozi membrano v dializno cevko. Protitelesa so bila iz prvotnega volumna 90 ml skoncentrirana na 2 ml. To pomeni, da so bila 45-krat bolj koncentrirana kot na začetku. Rezultati testa ELISA po koncentriranju in čiščenju protiteles so prikazani v preglednici 11. Glede na predhodne rezultate nekoncentriranih protiteles nam je koncentriranje protiteles uspelo. Iz preglednice 11 je razvidno tudi, da so kloni v mediju SFM proizvedli več monoklonskih protiteles kot v mediju DMEM, 10 % FBS. V tem primeru vsekakor ne moremo govoriti o večji afiniteti protiteles, glede na to, da so hibridomi kloni in proizvajajo identična protitelesa, z le-to razliko, da rastejo v drugih gojiščih. Iz preglednice 11 je razvidno, da je bila produkcija protiteles v gojišču DMEM nizka v primerjavi z negativnimi kontrolami in produkcijo protiteles v mediju SFM. V mediju SFM sta najbolj produktivna klena (po tem testu ELISA) 8D11G6 in 7E7H3. Oba rezultata pa sta neskladna s prejšnjimi ugotovitvami. Za klon 7E7H3 smo pri testih DIBA ugotovili, da naj sploh ne bi proizvajal protiteles, medtem ko naj bi 8D11G6 proizvajal nespecifična protitelesa. Za ta pojav ni logične razlage. DIBA za dokazovanje specifičnih IgG in test ELISA, ki smo ju izvajali sta podobni metodi. Razlikujeta se le v tem, da test DIBA izvajamo na nitrocelulozni membrani, test ELISA pa na mikrotiterski plošči in v testih uporabimo različne substrate za hrenovo peroksidazo. Supernatanti klonov 2C6G8, 5H2A7, 8F12G4 in 8F12G10 imajo po koncentriranju iz medija SFM pozitivno reakcijo pri testu ELISA. To potrjuje že dognano dejstvo, da proizvajajo specifična protitelesa. Pozitiven rezultat pokaže tudi supernatant klena 8B6D4, iz česar lahko sklepamo, da so prisotna specifična protitelesa. Obstaja lahko še eden razlog zakaj hibridomi po koncentriranju in čiščenju kar naenkrat dajo pozitivne rezultate na testih, pred tem pa jih niso. Testiranja na obeh testih DIBA smo izvedli s hibridomi po selekciji klonov. Prvih nekaj supernatantov nismo uporabili, saj smo klone namnoževali. Ker smo pri tem nekaj presaditev že naredili, so lahko nekateri kloni izgubili sposobnost

proizvodnje protiteles. Te klone smo uporabili nadalje še za ugotavljanje stabilnosti hibridomov pri proizvodnji specifičnih protiteles pri večkratnem presajanju, nakar smo jih zavrgli. Za test ELISA pa smo odmrznili klone, ki smo jih predhodno (tako po selekciji) shranili v dveh ponovitvah in ti kloni so bili tako manjkrat presajeni kot hibridomi pri testih DIBA.

Ugotavljali smo tudi kakšna redčitev proteinov *M. cynos* je primerna za elektroforezo SDS-PAGE in kasneje analizo Western blot. Po barvanju s Ponceau S smo dobili rezultate prikazane na sliki 11. Odločili smo se za uporabo redčitve 1:20. Proteinov ne sme biti niti preveč niti premalo, ker bi bilo obarvanje preveč izrazito oz. do obarvanja ne bi prišlo.

Na sliki 10 je viden profil proteinov sproščenih iz površin celic *M. cynos*, po barvanju z barvilom Coomassie blue. Kot že omenjeno so molekulske mase proteinov naslednje: 10, 12, 15, 19, 24, 30, 35, 40, 45, 55, 60, 65, 67, 70, 90, 95, 100, 110, 135, 190. Na sliki so dodani trije referenčni markerji. 10 kDa je dodan, ker je najverjetnejše prešel skozi membrano. To se je zgodilo, ker smo postopek prenosa na membrano izvajali nekoliko dlje (1 uro in 10 minut), saj smo predvidevali, da se bodo kljub večji zamreženosti gela prenesli tudi večji proteini. Iz dejstva, da se markerja 130 in 170 kDa nista vizualno pokazala na gelu, lahko sklepamo, da prenos večjih proteinov pri prenosu na membrano ni uspel oz. je minimalen.

Izvedli smo tudi imunsko barvanje proteinskega profila po prenosu na membrano (Western blot). Rezultati so prikazani na sliki 11. Trak A predstavlja SFM (negativna kontrola), trak C pa mišji imunski serum (pozitivna kontrola). Pri imunskemu serumu je lepo vidna pozitivna reakcija. Tako smo dokazali, da so posamezni proteini imunogeni. Ti proteini imajo naslednje molekulske mase: 12, 16, 22, 23, 24, 25, 27, 37, 38, 40, 45, 49, 55, 60, 65, 67 in 95 kDa. Prenos proteinov na membrano je tako potrjen, vendar je razvidno, da večji proteini niso bili uspešno preneseni. Iz trakov D in G (8D11G6 in 8F12G10) je razvidna specifična barvna reakcija s proteini, molekulskih mas 12 in 24 kDa. Iz tega lahko sklepamo, da gre verjetno za imunogen protein, ki je najverjetnejše sestavljen iz dveh enakih podenot, vendar bi bilo potrebno to hipotezo potrditi z dodatnimi raziskavami. Možno je tudi, da sta proteina različna, vendar imata enake oz. podobne epitope. To lahko sklepamo, ker je barvna reakcija na traku D (8D11G6) pri 12 kDa manj intenzivna. Lahko pa gre tudi za različen epitop na istem proteinu ali za protitelesa z nižjo afiniteto za isti epitop ali nižjo koncentracijo protiteles. Tu je potrebno ponovno poudariti, da smo analizo Western blot opravljali le s topnimi proteini *M. cynos*, medtem ko so hidridomi produkt imunizacije miške s celotnimi bakterijami. Manj specifičnih obarvanj po Western blotu je bilo pričakovanih, ker smo proteine obdelali z redukcijskimi agensi. Ti uničijo terciarne in kvartarne strukture proteinov. Vemo pa, da nekateri IgG nalegajo tudi na tako imenovane prostorske determinante epitopov (poznamo še linearne determinante epitopov, te naj bi bile v povprečju sestavljene iz 6 aminokislin). Nahajajo se na ločenih delih linearnega

aminokislinskega zaporedja, vendar so si v nativno zvitem proteinu sosednje. Pri razprtju takih mest pri linearizaciji proteinov se lahko afiniteta monoklonskih protiteles proti takim epitopom zmanjša ali celo popolnoma izgine (Vozelj, 2000).

Do sedaj je objavljena le ena referenca za 45 kDa velik imunogen protein *M. cynos* (896) (Rycroft in sod. 2007). Potrjen je tudi protein nevraminidaze *M. cynos* molekulske mase 105 kDa (Berčič in sod., 2011). Iz slike 11 je razvidno, da je miška Balb/c razvila protitelesa proti proteinu molekulske mase 45 kDa. Verjetno gre za isti imunogen protein kot pri okužbah psov v raziskavi Rycroft s sodelavci. Imunogenosti nevraminidaze (105 kDa) nismo uspeli dokazati. Način prisiljene imunizacije miške nam ne pove nič o naravnih mehanizmih patogeneze. Pri naravni okužbi je tudi manj imunogenih proteinov, le protein 45 kDa (Rycroft in sod., 2007), kot pri intraperitonealnem vbrizganju celotnega nabora proteinov bakterije v gostitelja (miš).

5.2 SKLEPI

- Vsaj 15 proteinov *M. cynos* (sev 896) je imunogenih za miško Balb/c. To so proteini molekulskih mas: 12, 16, 22, 23, 24, 25, 27, 37, 38, 40, 45, 49, 55, 60, 65, 67 in 95 kDa.
- Hibridomi rastejo hitreje (bolje) ali enako hitro v mediju SFM.
- Klon 8F12G10 tudi po daljšem presajanju (več kot 25 presaditev) proizvaja specifična protitelesa, je stabilen.
- Klona 8D11G6 in 8F12G6 proizvajata monoklonska protitelesa proti proteinoma *M. cynos* (sev 896) molekulskih mas 12 in 24 kDa.

Predlogi za nadaljnje raziskave in odprta vprašanja

Hibridome, ki smo jih uporabili v tem testiranju, lahko kadarkoli pridobimo v genski banki Laboratorija za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko na Rodici v Domžalah. Delo na področju raziskav monoklonskih protiteles proti proteinom *M. cynos* in samih proteinov se lahko nadaljuje. Veliko je ostalo še nerazrešenega. Ugotovili bi lahko koliko proteinov pri reduktivni elektroforezi SDS-PAGE razpade na podenote. Z nativno elektroforezo bi lahko tudi preizkusili ali reduktivna elektroforeza SDS-PAGE vpliva na vezavo protiteles na proteine *M. cynos*. Določili bi lahko tudi aminokislinske sekvene izbranih proteinov in jih primerjali s proteinimi drugih vrst mikoplazem in ugotavljalji njihovo sorodnost. Lahko bi ugotovljali aminokislinsko zaporedje ali zaporedje variabilnih regij RNK na imunoglobulinih in z reverznimi tehnikami naredili himerna protitelesa.

6 POVZETEK

Pasje mikoplazme oz. mikoplazme izolirane iz psov niso nujno gostiteljsko specifične. Najdemo jih nativno na sluznicah. Do danes poznamo 18 vrst pasjih mikoplazem. Mikoplazme povzročajo različne vrste bolezni pri psih: respiratorne bolezni, bolezni urinarnega trakta, neplodnost, kolitis, endokarditis, vnetje mandljev in mlečnih žlez.

Mycoplasmo cynos je Rosendal odkril leta 1973. Beseda »cynos« v prevodu pomeni »pasja«. Povzroča bolezni pljuč, očesne veznice, prostate, urinarnega trakta, vagine in prepucija. Sev 896 mikoplazme *M. cynos* je povzročil hujše oblike pljučnice pri mladičkih zlatega prinašalca. Mikoplazma je del raznih mešanih okužb: pasje kuge, zavetiščnega kašla in pasje pljučnice. Do sedaj so odkrili pasji imunski odgovor na protein *M. cynos* molekulske mase 45 kDa. Pri *M. cynos* je odkrita tudi nevraminidaza, zunajcelični protein molekulske mase 105 kDa.

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, kateri proteini *M. cynos* so imunogeni, ter pridobiti hibridome, ki proizvajajo protitelesa proti specifičnim proteinom, jih klonirati in testirati supernatante. Miška Balb/c je bila prvič imunizirana s celicami *M. cynos*. Poživitvena imunizacija je bila izvedena s topnimi proteini *M. cynos*. Preliminarni test ELISA pred selekcijo klonov je bil prav tako izведен s celotnim naborom proteinov *M. cynos*. Vsa naslednja testiranja so bila opravljena s topnimi proteini *M. cynos*. Rezultati testiranj po selekciji klonov so bili pričakovano manj intenzivni in manj številčni kot pri predhodnem testiranju. Pri predhodnem testiranju je test ELISA pokazal pozitivne reakcije na specifična IgG proti *M. cynos* pri naslednjih hibridomih: 1B4, 2B2, 2C6, 4D4, 5H2, 7E7, 8B6, 8D11, 8F12. Vse te hibridome smo klonirali in dobili 20 klonov, ki smo jih tekom testiranj dodatno selekcionirali. Pri testu DIBA za dokaz specifičnih protiteles so barvne reakcije pokazale, da specifične IgG proizvajajo naslednji hibridomi: 2C6G8, 8F12G4, 5H2H1, 5H2A7, 8B6B4 in 8F12G10. Supernatanti klonov reagirajo z različnimi proteini *M. cynos* molekulskih mas: 12, 33, 37, 43, 60 in 90 kDa. Mišji imunski serum, ki je služil kot pozitivna kontrola, pa reagira z vsaj 15 proteini: 12, 16, 22, 23, 24, 25, 27, 37, 38, 40, 45, 49, 55, 60, 65, 67 in 95 kDa. Proteina *M. cynos* (896) 12 in 65 kDa sta površinska, kar je bilo dokazano s testom IIPA. Tekom testiranja smo ugotovili, da se je produkcija IgG zmanjševala, zato smo supernatante hibridomov koncentrirali. Zaradi nestabilnosti genomov heterokariontskih celic, produkcija hibridomov s časom pada. To smo tudi dokazali. Po večkratnem presajjanju je bil zelo stabilen le klon 8F12G10. Ostali so popolnoma prenehali ali le delno proizvajali IgG. Klona 8D11G6 in 8F12G6 sta proizvajala monoklonska protitelesa proti proteinom *M. cynos* (sev 896) molekulskih mas 12 in 24 kDa, kar smo dokazali s posrednim encimsko imunskim testom (po prenosu na membrano).

7 VIRI

- Armstrong D., Yu B. 1970. Characterization of canine mycoplasmas by polyacrylamide gel electrophoresis and immunodiffusion. *Journal of Bacteriology*, 104, 1: 295-299
- Barykova Y.A., Logunov Y.D., Shmarov M.M., Vinarov A.Z., Fiev D.N., Vinarova N.A., Rakovskaya I.V., Baker P.S., Shyshynova I., Stephenson A.J., Klein E.A., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L., Gudkov A.V. 2011. Association of *Mycoplasma hominis* infection with prostate cancer. *Oncotarget*, 2, 4: 289-297
- Benčina D. 2002. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Pathology*, 31, 6: 535-547
- Benčina D. 2012. »Mikoplazme«. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, dusan.bencina@bf.uni-lj.si (osebni vir, 02. 02. 2012)
- Benčina D., Bradbury J.M. 1991. Indirect immunoperoxidase assay for the detection of antibody in chicken *Mycoplasma* infections. *Avian Pathology*, 20, 1: 113-124
- Benčina D., Kleven S.H., Elfaki M.G., Snoj A., Dovč P., Dorrer D., Russ I. 1994. Variable expression of epitopes on the surface of *Mycoplasma gallisepticum* demonstrated with monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 23, 1: 19-36
- Benčina D., Narat M., Bidovec A., Zorman-Rojs O. 2005. Transfer of maternal immunoglobulins and antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* to the allantoic and amniotic fluid of chicken embryos. *Avian Pathology*, 34, 6: 463-472
- Berčič R.L. 2009. Sinteza in učinkovitost nevraminidaz pri bakterijah *Mycoplasma gallisepticum* in *Mycoplasma synoviae*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 113 str.
- Berčič R.L., Cizelj I., Benčina M., Narat M., Bradbury J.M., Dovč P., Benčina D. 2012. Demonstration of neuraminidase activity in *Mycoplasma neurolyticum* and of neuraminidase proteins in three canine *Mycoplasma* species. *Veterinary Microbiology*, 155: 425-429
- Berčič R.L., Cizelj I., Dušanić D., Narat M., Zorman-Rojs O., Dovč P., Benčina D. 2011. Neuraminidase of *Mycoplasma synoviae* desialylates heavy chain of the chicken immunoglobulin G and glycoproteins of chicken tracheal mucus. *Avian Pathology*, 40, 3: 299-308

- Berčič R.L., Slavec B., Lavrič M., Narat M., Zorman-Rojs O., Dovč P. Benčina D. 2008. A survey of avian *Mycoplasma* species for neuraminidase enzymatic activity. *Veterinary Microbiology*, 130: 391-397
- Boguslavsky S., Menaker D., Lysnyansky I., Liu T., Levisohn S., Rosengarten R., Garcia M., Yoge D. 2000. Molecular characterization of the *Mycoplasma gallisepticum* pvpA gene which encodes a putative variable cytadhesin protein. *Infection and Immunity*, 68, 7: 3956-3964
- Böhm E., Voglauer R., Steinfellner W., Kunert R., Borth N., Katinger H. 2004. Screening for improved cell performance: selection of subclones with altered production kinetics or improved stability by cell sorting. *Biotechnology and Bioengineering*, 88, 6: 699-706
- Bolha L. 2010. Preverjanje nukleazne aktivnosti pri patogenih bakterijah izbranih vrst rodu *Mycoplasma*. Diplomsko delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije: 32-51
- Brown D.R., Whitcomb R.F., Bradbury J.M. 2007. Revised minimal standards for description of new species of the class *Mollicutes* (division *Tenericutes*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2703-2719
- Brownlie J., Chalker V.J., Erles K. 2007. Vaccine composition for vaccinating dogs against canine infectious respiratory disease. United States Patent Application Publication US2008/0220018 A1: 32 str.
- Chalker V. J., Barker E., Brownlie J. 2002. The use of PCR and culture for the detection of canine respiratory Mycoplasmas. V: 14th International Congress of International Organisation for Mycoplasmology, 07.-12.07.2002, Vienna, Austria, Wise K., Wewalka G. (eds.), Vienna, University of Vienna General Hospital: 74-92
- Chalker V.J. 2005. Canine mycoplasmas. *Research in Veterinary Science*, 79: 1-8
- Chalker V.J., Brooks H.W., Brownlie J. 2003. The association of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* with canine infectious respiratory disease. *Veterinary Microbiology*, 95: 149-156
- Chalker V.J., Brownlie J. 2004. Taxonomy of the canine *Mollicutes* by 16 S rRNA gene and 16 S/23 S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 537-542
- Chalker V.J., Owen W.M.A., Paterson C., Barker E., Brooks H., Rycroft A.N., Brownlie J. 2004. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. *Microbiology*, 150: 3491-3497

- Chambaud I., Wróblewski H., Blanchard A. 1999. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. Trends in Microbiology, 7, 12: 493-499
- Chvala S., Benetka V., Möstl K., Zeugswetter F., Spergser J., Weissenböck H. 2007. Simultaneous canine distemper virus, canine adenovirus type 2, and *Mycoplasma cynos* infection in a dog with pneumonia. Veterinary Pathology, 44: 508-512
- Ciccarelli F.D., Doerks T., Mering C., Creevey C.J., Snel B., Bork P. 2006. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. Science, 311, 5765: 1283-1287
- Citovsky V., Rottem S., Nussbaum O., Lester Y., Rott R., Loyter A. 1988. Animal viruses are able to fuse with prokaryotic cells. Fusion between Sendai or influenza virions and *Mycoplasma*. Journal of Biological Chemistry, 263, 1: 461-467
- Cizelj I., Berčič R.L., Dušanić D., Narat M., Kos J., Dovč P., Benčina D. 2011. *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* express a cysteine protease CysP, which can cleave chicken IgG into Fab and Fc. Microbiology, 157, 2: 362-372
- Cooper J. 2011. *Mycoplasma* and misidentified cell lines, one day workshop. Salisbury (UK), Health Protection Agency Culture Protection: 1 str.
<http://www.hpacultures.org.uk/services/training/mycoplasmaonedayworkshop.jsp>, (25. 10. 2011)
- Deutsch J., Salman M., Rottem S. 1995. An unusual lipid from the cell membrane of *Mycoplasma fermentans*. European Journal of Biochemistry, 227: 897-902
- Dybvig K., Voelker L.L. 1996. Molecular biology of mycoplasmas. Annual Review of Microbiology, 50: 25-57
- Eberle G., Kirchhoff H. 1976. Studies on the incidence of *Mycoplasma* in newborn and through cesarean-section-delivered dogs. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 5: 495-497
- Edward D.G., Freundt E.A. 1967. Proposal for *Mollicutes* as name of the class established for the order *Mycoplasmatales*. International Journal of Systematic Bacteriology, 17, 3: 267-268
- Euazeby J.B. 2011. List of prokaryotic names with standing in nomenclature – genus *Mycoplasma*. Toulouse, Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire: 61 str.
<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycoplasma.html>, (10. november 2011)
- Garrity G.M., Bell, J.A. Lilburn T.G. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. V: Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2, 2nd ed., Garrity G.M., Boone D.R., Castenholz R.W. (eds.). New York, Springer: 166-172

- Goding J. 1986. Monoclonal antibodies. principles and practice. 2nd ed. London, Academic Press: 315 str.
- Haier J., Nasralla M., Franco A.R., Nicolson G.L. 1999. Detection of mycoplasmal infecitons in blood of patients with rheumatiod arthritis. *Rheumatology*, 38: 504-509
- Harlow E., Lane D. 1988. Antibodies: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory: 298-299
- Hartmann A.D., Hawley J., Werckenthin C., Lappin M.R., Hartmann K. 2010. Detection of bacterial and viral organisms from the conjunctiva of cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12: 775-782
- Harvey H.A., Swords W.E., Apicella, M.A. 2001. The mimicry of human glycolipids and glycosphingolipids by the lipooligosaccharides of pathogenic *Neisseria* and *Haemophilus*. *Journal of Autoimmunity*, 16, 3: 257-262
- Himmelreich R., Hilbert H., Plagens H., Pirkl E., Li B.C., Herrmann R. 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, 24, 22: 4420-4449
- Jiang S., Zhang S., Langenfeld J., Lo S.C., Rogers M.B. 2008. *Mycoplasma* infection transforms normal lung cells and induces bone morphogenetic protein 2 expression by post-transcriptional mechanisms. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104: 580-594
- Köhler G., Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 5517: 495-497
- Koshiba H., Koshiba A., Daimon Y., Noguchi T., Iwasaku K., Kitawaki J. 2011. Hematoma and abscess formation caused by *Mycoplasma hominis* following cesarean section. *International Journal of Women's Health*, 3: 15-18
- Lein D.H. 1986. Canine *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and bacterial infertility. *Current Veterinary Therapy*, 9: 1240-1243
- Li L., Boniecki M.T., Jaffec J.D., Imai B.S., Yaud P.M., Luthey-Schultena Z.A., Martinisa S.A. 2011. Naturally occurring aminoacyl-tRNA synthetases editing-domain mutations that cause mistranslation in *Mycoplasma* parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 23: 9378-9383
- Liddell J.E., Cryer A. 1991. A practical guide to monoclonal antibodies. Chichester (UK), John Wiley & Sons, Ltd: 188 str.
- Ludwig W., Euzéby J., Whitman W.B. 2011. Road map of the phyla *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobactere*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and

Planctomycetes. V: Bergey's manual of systematic bacteriology, Part A., Vol. 4, 2nd ed. Krieg N.R., Ludwig W., Whitman W.B., Hedlund B.P., Paster B.J., Staley J.T., Ward N., Brown D., (eds.). New York, Springer: 575-643
<http://www.bergeys.org>, (13.10.2011)

Ludwig W., Schleifer K.H. 2005. Molecular phylogeny of bacteria based on comparative sequence analysis of conserved genes. microbial phylogeny and evolution, concepts and controversies. Oxford, University Press: 70-98

Lynn R.C. 1986. How to control canine infectious tracheobronchitis through vaccination? Veterinary Medicine, 81, 6: 544-550

Maniloff J. 1992. Phylogeny of mycoplasmas,. V: *Mycoplasmas*: Molecular biology and pathogenesis. Maniloff J., McElhaney R.N., Finch, L.R. Baseman J.B. (eds.). Washington D.C., American Society for Microbiology: 549-559

Maniloff J. 2002. Phylogeny and evolution. V: Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. Razin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publisher: 31-43

Mannering S.A., McAuliffe L., Lawes R.J., Erles K., Brownlie J. 2009. Strain typing of *Mycoplasma cynos* isolates from dogs with respiratory disease. Veterinary Microbiology, 135: 292-296

May M., Brown D.R. 2009. Secreted sialidase activity of canine mycoplasmas. Veterinary Microbiology, 137, 3-4: 380-383

McAuliffe L., Ellis R.J., Lawes J.R., Ayling R.D., Nicholas R.A.J. 2005. 16 S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. Journal of Medical Microbiology, 54: 731-739

McAuliffe L., Ellis R.J., Miles K., Ayling R.D., Nicholas R.A.J. 2006. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. Microbiology, 152: 913-922

Miles R.J. 1992. Catabolism in *Mollicutes*. Journal of General Microbiology, 138: 1773-1783

Minion F.C., Jarvill-Taylor K.J., Billings D.E., Tigges E. 1993. Membrane-associated nuclease activities in mycoplasmas. Journal of Bacteriology, 175, 24: 7842-7847

Miyata M., Ryu W., Berg H. 2002. Force and velocity of *Mycoplasma mobile* gliding. Journal of Bacteriology, 184: 1827-1831

Miyata M., Seto S. 1999. Cell reproduction cycle of mycoplasma. Biochimie, 81: 873-878

- Narat M. 2004. Priročnik za vaje pri predmetu imunske tehnologije. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 48 str.
- Narat M., Bicek A., Vadnjal R., Benčina D. 2004. Production, characterization and use of monoclonal antibodies recognizing IgY epitopes shared by chicken, turkey, pheasant and sparrow. *Food Technology and Biotechnology*, 42: 175-182
- Nascimento E.R., DaMassa A.J., Yamamoto R., Nascimento M.G.F. 1999. Plasmids in *Mycoplasma* species isolated from goats and sheep and their preliminary typing. *Revista de Microbiologia*, 30: 32-36
- NCBI. 2011. Taxonomy browser: *Mollicutes*. Bethesda, National center for biotechnolgy information: 2 str.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=31969&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>, (23.10.2011)
- Nelson P.N., Reynolds G.M., Waldron E.E., Ward E., Giannopoulos K., Murray P.G. 2000. Monoclonal antibodies. *Clinical Pathology*, 53: 111-117
- Noormohammadi A.H., Markham P.F., Kanci A., Whithear K.G. Browning G.F. 2000. A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. *Molecular Microbiology*, 35: 911-923
- Noormohammadi A.H., Markham P.F., Whithear K.G., Walker I.D., Gurevich V.A., Ley D.H., Browning G.F. 1997. *Mycoplasma synoviae* has two distinct phase-variable major membrane antigens, one of which is a putative hemagglutinin. *Infection and Immunity*, 65, 7: 2542-2547
- Oehlerking J., Kube M., Felder K.M., Matter D., Wittenbrink M.M., Schwarzenbach S., Kramer M.M., Hoelzle K., Hoelzle L.E. 2011. Complete genome sequence of the hemotrophic *Mycoplasma suis* strain KI3806. *Journal of Bacteriology*, 193, 9: 2369-2370
- Ozturk S.S., Øpalsson B. 2009. Loss of antibody productivity during long-term cultivation of a hybridoma cell line in low serum and serum-free media. *Hybridoma*, 9, 2: 167-175
- Pandey S., 2010. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 1, 2: 88-94
- Pennisi E. 2010. Synthetic genome brings new life to bacteria. *Science*, 328, 5981: 958-959

- Perepelchouk M., Wilson S.A.D., Bhattacharya B., Volokhovand D.V., Chizhikov V. 2010. Detection of mycoplasma contamination in cell substrates using reverse transcription – PCR assays. *Journal of Applied Microbiology*, 110: 54-60
- Pilo P., Vilei E.M., Peterhans E., Bonvin-Klotz L., Stoffel M.H., Dobbelaere D., Frey J. 2005. A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *Journal of Bacteriology*, 187,19: 6824-6831
- Polak-Vogelzang A.A., Hagenaars R., Nagel J. 1978. Evolution of an indirect immunoperoxidase test for identification of *Acholeplasma* and *Mycoplasma*. *Journal of General Microbiology*, 106: 241-249
- Protein Methods. 2011. Springfield, SIU School of Medicine: 2 str.
http://www.siumed.edu/~bbartholomew/course_material/protein_methods.htm, (19. 10. 2011)
- Razin S. 1964. Factors influencing osmotic fragility of *Mycoplasma*. *Journal of General Microbiology*, 36: 451-459
- Razin S. 1978. The mycoplasmas. *Microbiological Reviews*, 42: 414-470
- Razin S. 1985. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (*Mollicutes*). *Microbiological Reviews*, 49, 4: 419-455
- Razin S., Glaser G., Amikam D. 1984. Molecular and biological features of *Mollicutes* (mycoplasmas). *Annals of Microbiology*, Section A, 135: 9-15
- Razin S., Jacobs E. 1992. Mycoplasma adhesion. *Journal of General Microbiology*, 138: 407-422
- Razin S., Yoge D., Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 4: 1094-1156
- Roberts-Thomson P.J., Shepherd K. 1990. Molecular size heterogeneity of immunoglobulins in health and disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 79: 328-334
- Roggentin P., Schauer R., Hoyer L.L., Vimr E.R. 1993. The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer. *Molecular Microbiology*, 9, 5: 915-921
- Rosendal S. 1973. *Mycoplasma cynos*, a new canine *Mycoplasma* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23, 1: 49-54
- Rosendal S. 1975. Canine mycoplasmas: cultural and biochemical studies of type and reference strains. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, Section B, Microbiology*, 83, 5: 457-462

- Rosendal S. 1978. Canine mycoplasmas: pathogenicity of mycoplasmas associated with distemper pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*, 138, 2: 203-210
- Rosendal S. Black F.T. 1972. Direct and indirect immunofluorescence of unfixed and fixed mycoplasma colonies. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, Section B*, 80, 615-622
- Rosendal S., Valdivieso G.A. 1981. Enumeration of mycoplasmas after acridine orange staining. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 4: 1000-1002
- Rottem S. 2003. Interaction of Mycoplasmas with host cells. *Physiological Reviews*, 83: 417-432
- Rycroft A.N., Tsounakou E., Chalker V. 2007. Serological evidence of *Mycoplasma cynos* infection in canine infectious respiratory disease. *Veterinary Microbiology*, 120: 358-362
- Sampath R., Blyn B.L., Li F., Fernandez J.P., Hall T.A. 2011. Compositions for use in identification of members of the bacterial genus *Mycoplasma*. United States Patent Application Publication US 2011/0189687 A1: 38 str.
- Schumacher I.M., Brown M.B., Jacobson E.R., Collins B.R., Klein P.A. 1993. Detection of antibodies to a pathogenic mycoplasma in desert tortoises (*Gopherus agassizii*) with upper respiratory tract disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 6: 1454-1460
- Shimada Y., Deguchi T., Nakane K., Yasuda M., Yokoi S., Ito S., Nakano M., Ito S., Ishiko H. 2011. Macrolide resistance-associated 23 S rRNA mutation in *Mycoplasma genitalium*, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 6: 1148-1150
- Shoetensack H.M. 1934. Pure cultivation of filterable virus isolated from canine distemper. *Kitasato Archives of Experimental Medicine*, 11: 227-290
- Sirand-Pugnet P., Citti C., Barre A., Blanchard A. 2007. Evolution of *Mollicutes*: down a bumpy road with twists and turns. *Research in Microbiology*, 158: 754-766
- Slavec B., Berčič L.R., Cizelj I., Narat M., Zorman-Rojs O., Dovč P., Benčina D. 2011. Variation of *vlhA* gene in *Mycoplasma synoviae* clones isolated from chickens. *Avian Pathology*, 40, 5: 481-489
- Spergser J., Langer S., Muck S., Macher K., Szostak M., Rosengarten R. Busse H.J. 2011. *Mycoplasma mucosicanis* sp. nov., isolated from the mucosa of dogs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 716-721
- Spergser J., Rosengarten R. 2007. Identification and differentiation of canine *Mycoplasma* isolates by 16 S-23 S rDNA PCR-RFLP. *Veterinary Microbiology*, 125: 170-174

- Sunhwa H., Okjin K. 2012. Molecular identification of *Mycoplasma cynos* from laboratory beagle dogs with respiratory disease. Laboratory Animal Research, 28, 1: 61-66
- Sykes J. 2009. Canine infectious respiratory disease: the flu or not the flu?, Lancaster, Oregon Veterinary Medical Association: 5 str.
<http://oregonvma.org/files/Sykes-Canine-Infectious-Respiratory-Disease.pdf>, (09.11.2011)
- Tarshis M., Salman M., Rottem S. 1991. Fusion of *Mycoplasmas*: the formation of cell hybrids. FEMS Microbiology Letters, 82: 67-72
- Thermo Scientific. 2012. Page rulerTM prestained protein ladder. Burlington, Thermo Scientific: 2 str.
<http://www.fermentas.com/en/products/all/protein-electrophoresis/prestained-ladders/sm067-pageruler->, (05.06.2012)
- Thompson C.C., Vieira N.M, Vicente A.C.P., Thompson F.L. 2011. Towards a genome based taxonomy of mycoplasmas. Infection, Genetics and Evolution, 11, 7: 1798-1804
- Tong C.Y.W., Menson E., Lin J.P., Lim M. 2011. Prevalence of mycoplasma encephalitis. Lancet Infectious Diseases, 6, 1: 425-426
- Vimr E.R., Kalivoda K.A., Deszo E.L., Steenbergen S.M. 2004. Diversity of microbial sialic acid metabolism. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68, 1: 132-153
- Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 66-69
- Walker M.J. 2002. The protein protocols handbook. 2nd ed. New Jersey, Humana Press: 60-138
- Werner E. 2007. Rapid determination and quantification of *Mycoplasma* contamination using DNA chip technology. United States Patent Application Publication US2007/0275378 A1: 14 str.
- Western blot. 2011. San Francisco, Wikipedia.org: 1 str.
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/93/Western_blot_transfer.png, (19. 10. 2011)
- Whithford H.W., Rosenbusch F.R., Lauerman H.L. 1994. Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis. Canadian Veterinary Journal, 36: 643-644
- Windsor H., Windsor D. 2007. *Mycoplasma cynos*. Reigate, Mycoplasma experience Ltd: 1 str. <http://www.mycoplasma-exp.com/98210.htm>, (26. 10. 2011)

- Wise K.S., Calcutt M.J., Foecking M.F., Röske K., Madupu R., Methe B.A. 2011. Complete genome sequence of *Mycoplasma bovis* type strain PG45 (ATCC25523). *Infection and Immunity*, 79, 2: 982-983
- Woese C.R., Stackebrandt E., Ludwig W. 1984. What are mycoplasmas: the relationship of tempo and mode in bacterial evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 21: 305-316
- Wolf M., Müller T., Dandekar T. Pollack J.D. 2004. Phylogeny of *Firmicutes* with special reference to *Mycoplasma (Mollicutes)* as inferred from phosphoglycerate kinase aminoacid sequence data. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 871-875
- Wolfgang L., Schleifer K.H., Whitman W.B. 2009. Revised road map to the phylum *Firmicutes*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 3. 2nd ed. The *Firmicutes*. Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R. Staley J.T. (eds.). New York, Springer: 1-13
- Zakon o zaščiti živali. 2007. Uradni list republike Slovenije št. 17, 43: 5943-5942
- Zakrajšek T. 2008. Nevraminidazna aktivnost bakterije *Mycoplasma canis*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 75 str.
- Zeugswetter F., Weissenböck H., Shibly S., Hassan J., Spergser J. 2007. Lethal bronchopneumonia caused by *Mycoplasma cynos* in a litter of golden retriever puppies. *Veterinary Record*, 161: 626-628
- Zhao H., Dreses-Werringloer U., Davies P., Marambaud P. 2008. Amyloid-beta peptide degradation in cell cultures by mycoplasma contaminants. *BioMed Central Research Notes*, 1, 1: 38-44

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Mojci Narat za vodenje, strokovne nasvete, pregled diplomske naloge in prijazne besede.

Prav tako se zahvaljujem znanstvenemu svetniku dr. Dušanu Benčini za hiter pregled diplomske naloge in mnoge koristne nasvete.

Zahvaljujem se asistentki dr. Ireni Oven. Hvala za nesebično pomoč in nasvete v laboratoriju.

Zahvaljujem se tudi kolegom Ani Zanjkovič, Ivanki Cizelj, Daliborki Dušanič, Luku Bolhi za marsikateri koristeni nasvet in informacijo pri laboratorijskem delu.

Zahvaljujem se tudi moji zaročenki Jasni Čretnik za koristne nasvete pri oblikovanju, pregled diplomskega dela, skrb in podporo.

Zahvaljujem se tudi svoji družini za vso podporo.

Zahvaljujem se tudi sodelavkam Evridiki Morsini Berus, Vesni Bukovec, Jasmini Pavišič, Luani Tomažič, Lidiji Kovačič in celotnemu kolektivu Oddelka za kakovost embalaže v Krki za skrb, potrpljenje in podporo.

Nazadnje gre zahvala tudi vsem, ki vas morda nisem omenil in na kakršenkoli način pripomogli pri nastanku tega dela.

PRILOGA A

Vzorci potovanja lis referenčnega standarda SM0671 pri različnih zamreženostih gelov za elektroforezo (Thermo Scientific, 2012)

Gel type Gel concentration Running buffer	Tris-Glycine						Tris-Acetate*			Bis-Tris*		
	4-20%	8-16%	10-20%	8%	10%	12%	15%	3-8%	7%	4-12%	10%	12%
% lenght of gel												
10												
20	170	170	170	170	170	170	170	170	170	150	140	140
30	130	130	130	130	130	130	130	130	130	100	115	115
40	100	100	100	100	100	100	100	100	100	70	80	80
50	70	70	70	70	70	70	70	70	70	55	65	65
60	55	55	55	55	55	55	55	55	55	40	50	50
70	40	40	40	40	40	40	40	40	40	35	40	40
80	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	30	30
90	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
100	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

* migration patterns were determined using respective NUPAGE® precast gels.