

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jana KALAN

NEVRAMINIDAZNA AKTIVNOST PRI BAKTERIJI
Mycoplasma corogypsi

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

NEURAMINIDASE ACTIVITY OF THE BACTERIUM
Mycoplasma corogypsi

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

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 Univerze v Ljubljani na Rodici pri Domžalah. Podpisana Jana Kalan se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Mojco Narat, za somentorja dr. Dušana Benčino in za recenzenta prof. dr. Toma Turka.

Mentorica: prof. dr. Mojca NARAT

Somentor: dr. Dušan BENČINA

Recenzent: prof. dr. Tom TURK

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

Član: znanstveni svetnik dr. Dušan BENČINA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Recenzent: prof. dr. Tom TURK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jana KALAN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 577.151:579.222(043)=163.6
- KG encimi/sialidaza/nevraminidaza/nevraminidazna aktivnost/mikoplazme/
Mollicutes/ *Mycoplasma*/*Mycoplasma corogypsi*
- AV KALAN, Jana
- SA NARAT, Mojca (mentorica)/BENČINA, Dušan (somentor)/TURK, Tom (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jaminikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
- LI 2010
- IN NEVRAMINIDAZNA AKTIVNOST PRI BAKTERIJI *Mycoplasma corogypsi*
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XII, 67 str., 12 pregled., 10 sl., 66 vir.
- IJ sl
- JI sl/an
- AI Nevraminidaza (sialidaza) je eksoglukozidaza, ki hidrolizira z α -glikozidno vezjo vezano sialično kislino na glikoproteine, glikolipide in oligosaharide. Sintetizira jo veliko mikroorganizmov, ki živijo v stiku z višjimi organizmi, nevraminidaza pa je tudi pomemben virulenčni dejavnik. Med mikoplazmami jo sintetizira le nekaj vrst. Nevraminidazno aktivnost smo dokazali pri bakteriji *Mycoplasma corogypsi*. S preverjanjem nevraminidazne aktivnosti v celični suspenziji *M. corogypsi*, v rastnem mediju brez celic, v membranski in citoplazemski frakciji smo dokazali, da *M. corogypsi* sintetizira na membrano vezano nevraminidazo ter da jo v topni obliki tudi sprošča v medij. Aktivnost nevraminidaze je zelo močna. Encim izgubi aktivnost po enourni inkubaciji pri 55 °C, najvišjo aktivnost ima med vrednostmi pH 8 in 10, kalcijevi ioni imajo na aktivnost zanemarljiv učinek. V vzorcu smo želeli pridobiti čim bolj očiščen encim, zato smo uporabili različne metode odstranjevanja ostalih proteinov. Proteine *M. corogypsi* smo ločili s SDS-PAGE elektroforezo in jih prenesli na membrano ter določili N-terminalno aminokislinsko zaporedje proteina z molekularno maso 110 kDa. Enako molekularno maso je namreč imel protein z nevraminidazno aktivnostjo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 577.151:579.222(043)=163.6

CX enzymes/sialidases/neuraminidases/neuraminidase activity/mycoplasmas/
Mollicutes/ *Mycoplasma*/*Mycoplasma corogypsi*

AU KALAN, Jana

AA NARAT, Mojca (supervisor)/BENČINA, Dušan (co-advisor)/TURK, Tom (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jaminikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology

PY 2010

TI NEURAMINIDASE ACTIVITY OF THE BACTERIUM *Mycoplasma corogypsi*

DT Graduation thesis (university studies)

NO XII, 67 p., 12 tab., 10 fig., 66 ref.

LA sl

AL sl/an

AB Neuraminidase is exo-glucosidase that hydrolyses α -glycosidically bound sialic acids which is mostly found as terminal constituent of glycoproteins, glycolipids and oligosaccharides. Neuraminidases are synthesized by many microorganisms living in the contact with higher organisms. Neuraminidase is also important virulence factor. Only few mycoplasmas synthesize neuraminidase. We determined neuraminidase activity of *Mycoplasma corogypsi*. Cell suspension of *M. corogypsi*, growth media, membrane fraction and cytoplasmic fraction were tested for neuraminidase activity. Results show that membrane bound neuraminidase and soluble types of enzyme are produced. Activity is very strong. After one hour of incubation at 55°C, enzyme loses its activity. The highest activity is evident between pH 8-10, calcium ions has only minor influence on activity. We used different methods for purification of enzyme to eliminate other proteins in sample. After *M. corogypsi* proteins were separated with SDS-PAGE electrophoresis and transferred to a membrane, we determined N-terminal amino acid sequence of the protein with molecular weight of 110 kDa. This molecular weight was identical to molecular mass of the protein with neuraminidase activity.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PREGLEDNIC	X
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 Taksonomija in filogenija	4
2.2 ROD <i>Mycoplasma</i>	5
2.2.1 Genom	5
2.2.2 Membrana	6
2.2.3 Naravni habitat	7
2.2.4 Gibljivost	7
2.2.5 Patogeneza	8
2.3 MIKOPLAZME PRI PTICAH	10
2.3.1 <i>Mycoplasma corogypsi</i>	10

2.4	SIALIČNA KISLINA	11
2.4.1	Struktura sialične kisline	11
2.4.2	Pomen sialične kisline za bakterije	13
2.4.3	Načini pridobivanja sialične kisline pri mikroorganizmih	14
2.5	NEVRAMINIDAZA	15
2.5.1	Substrati za nevraminidaze	15
2.5.2	Geni za nevraminidaze in primarna struktura encima	16
2.5.3	Tipi in molekulske mase nevraminidaz	16
2.5.4	Optimalni pH in temperatura, vpliv kalcijevih ionov	17
2.5.5	Vloga nevraminidaz pri bakterijah	18
2.5.6	Nevraminidaze pri mikoplazmah	19
3	METODE IN MATERIALI	20
3.1	GOJENJE KULTURE <i>Mycoplasma corogypsi</i>	20
3.2	PRIPRAVA VZORCEV ZA DOLOČANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI	20
3.2.1	Priprava supernatanta in skoncentriranih celic kulture <i>M. corogypsi</i>	21
3.2.2	Priprava lizata celic <i>M. corogypsi</i>	21
3.2.3	Priprava filtrata iz supernatanta kulture <i>M. corogypsi</i>	22
3.3	DOLOČANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI	22
3.3.1	Določanje nevraminidazne aktivnosti s fluorogenim substratom	22
3.3.2	Določanje nevraminidazne aktivnosti s kromogenim substratom	23
3.4	TEMPERATURA INAKTIVACIJE NEVRAMINIDAZE	24
3.5	DOLOČANJE pH OPTIMUMA IN VPLIVA KALCIJEVIH IONOV NA DELOVANJE NEVRAMINIDAZE	24
3.6	ELEKTROFOREZA	25
3.6.1	Priprava vzorcev	25
3.6.2	Referenčni markerji	25
3.6.3	Parametri in potek elektroforeze	26
3.6.4	Barvanje elektroforeznega gela	27
3.7	PRENOS PROTEINOV Z ELEKTROFOREZNEGA GELA NA MEMBRANO	27
3.8	PREVERJANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI NA MEMBRANI	28

3.9	ELEKTROELUCIJA PROTEINOV IZ ELEKTROFOREZNEGA GELA	29
3.10	OBARJANJE PROTEINOV V SUPERNATANTU Z NASIČENIM AMONIJEVIM SULFATOM	30
3.11	GELSKA KROMATOGRAFIJA	31
3.12	PREVERJANJE PRISOTNOSTI PRAŠIČJIH IgG PROTITELES V VZORCU	32
3.13	ODSTRANJEVANJE PRAŠIČJIH IgG PROTITELES IZ VZORCA	32
3.13.1	Odstranjevanje prašičjih IgG protiteles z gelom Concavalin A	33
3.13.2	Odstranjevanje prašičjih IgG protiteles s proteinom G	33
4	REZULTATI	34
4.1	NEVRAMINIDAZNA AKTIVNOST <i>Mycoplasma corogypsi</i>	34
4.2	DOLOČANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI	35
4.2.1	Prisotnost nevraminidaze v celični usedlini	35
4.2.2	Prisotnost nevraminidaze v supernatantu in filtratu supernatanta	35
4.2.3	Prisotnost nevraminidaze v lizatu celic	36
4.3	PRIMERJAVA DOLOČANJA NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI S FLUOROGENIM IN KROMOGENIM SUBSTRATOM	36
4.3.2	Določanje nevraminidazne aktivnosti s kromogenim substratom BIN	37
4.4	TEMPERATURNA INAKTIVACIJA NEVRAMINIDAZE	37
4.5	DOLOČANJE pH OPTIMUMA IN VPLIVA KALCIJEVIH IONOV NA DELOVANJE NEVRAMINIDAZE	38
4.6	OBARJANJE PROTEINOV V SUPERNATANTU Z NASIČENIM AMONIJEVIM SULFATOM	39
4.7	PREVERJANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI FRAKCIJE PO GELSKI KROMATOGRAFIJI PRECIPITATA S 50% AMON SULFATOM	40
4.8	PREVERJANJE PRISOTNOSTI PRAŠIČJIH IgG PROTITELES V VZORCU	42
4.8.1	Odstranjevanje prašičjih IgG iz vzorca s Concanavalin A gelom	42
4.8.2	Odstranjevanje prašičjih IgG iz vzorca s proteinom G	43

4.9	POSKUS IDENTIFIKACIJE NEVRAMINIDAZE V PROTEINSKEM PROFILU <i>M. corogypsi</i>	44
4.10	ELEKTROELUCIJA PROTEINOV IZ ELEKTROFOREZNEGA GELA	45
4.10.1	Preverjanje nevraminidazne aktivnosti po elektroeluciji	45
4.10.2	Elektroforezni gel po elektroeluciji	46
4.11	DOLOČITEV N-TERMINALNE AMINOKISLINSKE SEKVENCE PROTEINA VELIKOSTI 110 kDa	46
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	48
5.1	RAZPRAVA	48
5.3	SKLEPI	54
6	POVZETEK	55
7	VIRI	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura N-acetilnevraminske kisline (Neu5Ac) in N-glikolilnevraminske kisline (Neu5Gc) (Vimr in sod., 2004: 133)	12
Slika 2: Določanje nevraminidazne aktivnosti s fluorogenim substratom MUAN	36
Slika 3: Nevraminidazna aktivnost na poliviniliden fluoridni membrani blokirani v 0,5% Tween PBS 30 minut	41
Slika 4: Nevraminidazna aktivnost na neblokirani poliviniliden fluoridni membrani	41
Slika 5: Test DIBA za preverjanje prisotnosti prašičjih IgG protiteles s konjugiranimi rabbit anti pig protitelesi	42
Slika 6: Test DIBA za preverjanje prisotnosti prašičjih IgG protiteles s konjugiranimi rabbit anti pig protitelesi	43
Slika 7: Profil proteinov <i>M. corogypsi</i> v gelu po SDS poliakrilamidni elektroforezi	44
Slika 8: Prikaz delov elektroforeznega gela, ki smo jih odrezali za elektroelucijo	45
Slika 9: Elektroforezni gel po elektroeluciji	46
Slika 10: Profil proteinov <i>M. corogypsi</i> na poliviniliden fluoridni membrani	47

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Taksonomija razreda <i>Mollicutes</i> (Garrity in sod., 2007)	4
Preglednica 2: Sestava 8% ločevalnega gela za SDS PAGE elektroforezo	26
Preglednica 3: Sestava 4% razvijalnega gela za SDS PAGE elektroforezo	26
Preglednica 4: Sestava pufrov za elektroelucijo	30
Preglednica 5: Primerjava nevraminidazne aktivnosti v kulturi <i>M. corogypsi</i> in v vzorcu referenčne nevraminidaze <i>C. perfringens</i> (Sigma, N2876)	34
Preglednica 6: Primerjava nevraminidazne aktivnosti med supernatantom in filtratom supernatanta kulture <i>M. corogypsi</i>	35
Preglednica 7: Določanje nevraminidazne aktivnosti s kromogenim substratom BIN	37
Preglednica 8: Temperaturna inaktivacija nevraminidaze	38
Preglednica 9: Rezultati inkubacije nevraminidazne aktivnosti celic <i>M. corogypsi</i> pri različnih pH vrednostih	39
Preglednica 10: Rezultati inkubacije nevraminidazne aktivnosti celic <i>M. corogypsi</i> pri različnih pH vrednostih z 10 mM koncentracijo CaCl ₂	39

Preglednica 11: Nevraminidazne aktivnosti v sedimentih (S) in supernatantih (SPN) po obarjanju proteinov s 30%, 50% in 70% koncentracijo amonijevega sulfata in centrifugiranju	40
Preglednica 12: Nevraminidazna aktivnost na blokirani in neblokirani poliviniliden fluoridni membrani	42

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APS	amonijev persulfat
ATP	adenin trifosfat
BIN	sol 5-bromo-4-kloro-3-indolil- α -D-N-acetilnevraminske kisline
CAPS	3-cikloheksilamino 1-propansulfonska kislina
CFU	število enot, ki tvori kolonije (<u>colony forming units</u>)
DIBA	encimsko imunski test (<u>dot immuno-binding assay</u>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EBP	pufer za prenos proteinov iz gela na membrano (elektroblotting pufer)
MUAN	2'-(4-metillumbeliferil)- α -D-N-acetilnevraminska kislina
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
PBS	fosfatni pufer (<u>phosphate buffer solution</u>)
SDS	natrijev dodecil sulfat
SDS PAGE	elektroforeza v poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom
TEMED	tetrametiletildiamin
TRIS	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol
Tween 20	neionski detergent

1 UVOD

Mikoplazme so predstavniki razreda *Mollicutes*, njihove glavne značilnosti so odsotnost celične stene in majhen genom. V naravi so razširjene kot paraziti ljudi in živali, najdemo jih predvsem na sluznicah, okužbe, ki jih povzročajo pa so navadno blage in kronične (Razin in sod., 1998). *Mycoplasma corogypsi* je bila izolirana z ognjoka na podplatu črnega jastreba (Panangala in sod., 1993).

Sialična kislina je običajno terminalni del glikoproteinov, glikolipidov in oligosaharidov, na katere je navadno vezana z α -glikozidno vezjo (Vimr in sod., 2004). Bakterije lahko sialično kislino uporabljajo kot receptorje za vezavo na gostiteljske celice, kot vir dušika in ogljika ter za izmikanje imunskemu sistemu gostitelja (Roberts in sod., 1989; Vimr in sod., 2004; Severi in sod., 2005; Harvey in sod., 2001).

Nevraminidaza je encim, ki s cepitvijo α -glikozidne vezi odceplja sialično kislino z glikokonjugatov (Abrashev in Dulguerova, 2000). Nevraminidaze so pogosti encimi pri živalih naddebla Deuterostomia in pri mikroorganizmih, predvsem živalskih patogenih in komenzalnih (Roggentin in sod., 1993).

Nevraminidaza je lahko sproščena v okolje, vezana na površino celice ali pa se nahaja v celici (Roggentin in sod., 1993). Večina nevraminidaz ima molekulsko maso med 40 kDa in 150 kDa (Abrashev in Dulguerova, 2000). Optimalni pH za delovanje bakterijskih nevraminidaz je med 5 in 7, temperaturni optimum pa med 35–40 °C. Nevraminidaze nekaterih bakterijskih vrst za svoje delovanje nujno potrebujejo kalcijeve ione (Abrashev in Dulguerova, 2000). Nevraminidaze bakterijam pomagajo pri širjenju v gostitelju, pridobivanju hranil, lahko so vpletene v nastanek avtoimunskega odziva gostitelja med okužbo (Ezepchuk in sod., 1974, cit. po Abrashev in Dulguerova, 2000; Roggentin in sod., 1988; Kahane in sod., 1990).

1.1 NAMEN DELA

Namen dela je bil potrditi nevraminidazno aktivnost pri bakteriji *Mycoplasma corogypsi* in protein vsaj delno opisati. Določiti smo želeli optimalni pH, vpliv kalcijevih ionov in temperaturno območje delovanja nevraminidaze. Zanimalo nas je tudi, kakšen tip nevraminidaze sintetizira bakterija *M. corogypsi* (znotraj celičen, membransko vezan, sekretorni encim), kolikšno molekulsko maso ima encim in mu določiti vsaj delno N-terminalno aminokislinsko zaporedje.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAZRED *Mollicutes*

Razred *Mollicutes* je uvrščen v deblo *Firmicutes* v domeni *Bacteria* (Johansson in Pettersson, 2002). V razred *Mollicutes* so uvrščene bakterije z majhno velikostjo celic, odsotnostjo celične stene, reduciranim genomom in poenostavljenimi metabolnimi potmi (Sirand-Pugnet in sod., 2007). Ime razreda izhaja iz glavne značilnosti teh mikroorganizmov: odsotnost celične stene (latinsko: *mollis* – mehek; *cutis* – koža) (Razin in sod., 1998). So najmanjši znani prokarionti, ki niso obvezni znotrajcelični paraziti in so sposobni samostojnega razmnoževanja, imajo majhen genom, majhno število rRNA operonov in tRNA genov ter omejeno metabolno aktivnost (Bove, 1993).

Razred je razdeljen na pet družin, devet rodov in približno 200 vrst. Štiri rodove (*Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Phytoplasma*) so našli v povezavi z rastlinami in insekti, dva rodova (*Anaeroplasma* in *Asteroleplasma*) vključujeta anaerobe v govejem vampu, dva rodova (*Mycoplasma* in *Ureoplasma*) pa tvorita družino *Mycoplasmataceae*, katere gostitelji so ribe, ptiči, plazilci in sesalci (Sasaki, 2006; Johansson in Pettersson, 2002).

Analize 16S rRNA genov kažejo, da so se predstavniki razreda *Mollicutes* razvili pred približno 605 milijoni let iz po Gramu pozitivnih bakterij z nizkim deležem gvanina in citozina (G + C). Prednik predstavnikov razreda *Mollicutes* je najverjetneje izgubil možnost sinteze celične stene, nekatere biosintetske poti in rRNA gene, zaradi česar se je njegov genom zmanjšal. Prednik najverjetneje ni bil obligatni parazit in ni potreboval holesterola za rast in replikacijo. Pred 470 milijoni let pa so se mikroorganizmi razreda *Mollicutes* ločili v dve glavni filogenetski veji: eno vejo predstavljajo rodovi *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma* in *Phytoplasma*,

drugo vejo pa rodovi *Spiroplasma*, *Mesoplasma*, *Entomoplasma*, *Mycoplasma* in *Ureaplasma* (Maniloff, 2002).

2.1.1 Taksonomija in filogenija

Razred *Mollicutes* je uvrščen v deblo *Firmicutes*. Sestavljajo ga družine *Mycoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Anaeroplasmataceae*, *Entomoplasmataceae*, *Acholeplasmataceae* in *Erysipelochaceae*. Delitev razreda *Mollicutes* na redove, družine in rodove je prikazana v preglednici 1.

Preglednica 1: Taksonomija razreda *Mollicutes* (Garrity in sod., 2007).

Razred *Mollicutes*

Red *Mycoplasmatales*

Družina *Mycoplasmataceae*

Rod *Mycoplasma*

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

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

Rod *Ureaplasma*

Red *Entomoplasmatales*

Družina *Entomoplasmataceae*

Rod *Entomoplasma*

Rod *Mesoplasma*

Družina *Spiroplasmataceae*

Rod *Spiroplasma*

Red *Acholeplasmatales*

Družina *Acholeplasmataceae*

Rod *Acholeplasma*

Rod *Phytoplasma*

Red *Anaeroplasmatales*

Družina *Anaeroplasmataceae*

Rod *Anaeroplasma*

Rod *Asteroleplasma*

Red *Incerate sedis*

Družina *Erysipelotrichaceae*

Rod *Erysipelotrix*

Rod *Bulleidia*

Rod *Holdemania*

Rod *Solobacterium*

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

2.2 ROD *Mycoplasma*

Mikoplazme so organizmi brez celične stene. Najverjetneje so najmanjši organizmi, ki so sposobni samostojne rasti. Zaradi majhnega genoma (od 580 kb do 1300 kb) in preproste celične strukture so evolucijsko zelo zanimivi. Zaradi odsotnosti celične stene se po Gramu barvajo negativno, vendar so filogenetsko sorodni Gram pozitivnim bakterijam z nizko vsebnostjo gvanina in citozina (Madigan in sod., 2003). Mikoplazme so lahko pleomorfnih oblik. Zaradi odsotnosti celične stene pa so običajno okrogle, s premerom 0,3–0,8 μm . Nekatere vrste mikoplazem so lahko hruškaste oblike s pritrditvenim organelom na terminalnem delu ali pa tvorijo filamente različnih dolžin, ki so lahko razvejani (Razin, 1978). Zaradi manjkajoče celične stene so občutljive na osmotski šok in detergente, na agarških gojiščih rastejo v obliki kolonij, katerih oblika spominja na ocvrto jajce (Razin in Oliver, 1961). Zaradi nerigidne strukture lahko prehajajo pore filtrov manjše od 0,5 μm , med tem ko jih druge bakterije ne morejo. Poleg tega pa mikoplazme niso občutljive na antibiotike, ki delujejo na sintezo celične stene (Sirand-Pugnet in sod., 2007).

2.2.1 Genom

Mikoplazemski genom je v obliki dvoverižne krožne DNA molekule. Značilna je visoka vsebnost adenina in timina ter nizka vsebnost citozina in gvanina (od 23.77 % GC za *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* do 40.00 % GC za *M. pneumoniae*, s srednjo vrednostjo 27.73 % GC) (Sirand-Pugnet in sod., 2007). Mikoplazme so

mikroorganizmi z najmanjšim genomom (od 580 kb pri *Mycoplasma genitalium* (Fraser in sod., 1995) do 1300 kb pri *Mycoplasma iowae* (Grau in sod., 1991)), velikost pa varira tudi znotraj iste vrste (Vasconcelos in sod., 2005). Kodon UGA, ki je univerzalen za stop kodon, pri mikoplazmah kodira aminokislino triptofan, kar je značilno tudi za mitohondrije (Osawa in sod., 1992). Posledice redukcije genoma so počasnejša rast in sinteza proteinov ter odvisnost od hranil gostitelja (maščobnih kislin, holesterola, vitaminov, purinov, pirimidinov in aminokislin). Izven gostitelja mikoplazme ne preživijo dolgo (Razin in sod., 1998).

2.2.2 Membrana

Membrana mikoplazem je sestavljena iz dveh tretjin proteinov, ostalo maso predstavljajo lipidi. Mikoplazme imajo zelo velik delež lipoproteinov, kar za ostale prokariote ni značilno, saj imajo le omejen delež lipoproteinov. Lipoproteini predstavljajo tudi glave antigenske komponente mikoplazem. Membrana je tako kot večina bioloških membran zgrajena iz fosfolipidov, glikolipidov in nevtralnih lipidov. Mikoplazme so popolnoma ali delno nezmožne sinteze maščobnih kislin, zato izkoriščajo gostiteljeve. Za svojo rast potrebujejo holesterol (edine med prokarioti), ki ga ne morejo sintetizirati. Holesterol vgrajujejo v membrane, saj vpliva na uravnavanju fluidnosti membrane (Razin in sod., 1998).

Podatek, da imajo mikoplazme le en tip membrane (plazemsko membrano), je zelo uporaben za študije membran. Po izolaciji membran smo lahko prepričani, da vzorec ni kontaminiran z drugimi tipi membran. Pri mnogih mikoplazmah lahko za ločitev membrane od citoplazemske vsebine uporabimo enostavne tehnike osmotske lize (Rodwell in Whitcomb, 1983).

2.2.3 Naravni habitat

Mikoplazme so v naravi zelo razširjene kot paraziti ljudi, sesalcev, plazilcev, rib, členonožcev in rastlin (Razin in sod., 1998). Živalskim in človeškim mikoplazmam predstavljajo naravni habitat sluznice dihalnega in urogenitalnega trakta, oči, mlečne žleze in sklepi. Okužbe, ki jih povzročajo, so običajno blage, a kronične, poškodbe, ki nastanejo, pa so večkrat tudi posledica škodljivih učinkov imunskega odziva gostitelja. Pravzaprav so mikoplazme »idealni paraziti«, ki navadno dolgo preživijo v gostitelju (Razin, 1978). Zaradi parazitskega načina življenja so od gostitelja povsem odvisni in zato so njihovi gostitelji in okužena tkiva specifični (Razin in sod., 1998).

2.2.4 Gibljivost

Večina mikoplazem je negibljivih in nimajo bičkov. Vendar pa nekateri predstavniki rodu *Mycoplasma* (tudi nekateri patogeni za človeka in živali) polzijo po mokrih površinah. Mikoplazme lahko razdelimo v dve skupini glede na morfologijo celic. Prva skupina ima morfološko različno polarne celice s strukturami, ki celici omogočajo adhezijo in polzenje po površini. Druga skupina takih struktur nima. Natančen mehanizem polzenja še ni znan (Trachtenberg, 1998; Miyata in Seto, 1999).

Veliko mikoplazem lahko s polarnimi strukturami polzi po površini. Med polzenjem najverjetneje igra pomembno vlogo pritrditveni organel, ki je med gibanjem na tistem polu bakterije, ki je obrnjen v smer gibanja (Miyata in Uenoyama, 2002). Povprečna hitrost polzenja je 0,1 $\mu\text{m/s}$ pri *M. genitalium*, 0,3–0,4 $\mu\text{m/s}$ pri *M. pneumoniae* in 2,0–4,5 $\mu\text{m/s}$ pri *M. mobile* (Miyata in Seto, 1999). Pri *M. mobile* je hitrost gibanja odvisna tudi od starosti kulture oz. od oblike celic: podolgovate celice iz stare kulture se gibajo počasneje (0–0,1 $\mu\text{m/s}$) od stožčastih celic iz mlajše kulture (2,5 $\mu\text{m/s}$) (Miyata in Uenoyama, 2002).

2.2.5 Patogeneza

Mikoplazme so razvile mehanizme, ki jim pomagajo pri izmikanju imunskemu sistemu gostitelja ter pri prenosu med gostitelji. To jim omogoča, da se v gostitelju razmnožujejo in preživijo v njem dolgo časa. Pri izmikanju gostiteljevemu imunskemu sistemu jim pomagajo mimikrija gostiteljskih antigenov, preživetje znotraj fagocitirajočih in nefagocitirajočih celic ter fenotipska variabilnost (Rottem, 2003).

Pri molekularni mimikriji gre predvsem za antigenske epitope, ki so skupni nekaterim mikoplazmam in gostiteljskim celicam. Antigenski epitopi naj bi bili vpleteni v izmikanje imunskemu sistemu in/ali nastanku avtoimunskih protiteles med okužbo. Molekularna mimikrija patogenemu mikroorganizmu olajša okužbo s tem, da ga imunski sistem gostitelja ne prepozna takoj ob vstopu in je zato imunski odziv zakasnel (Cahill in sod., 1971). Ko imunski sistem gostitelja odgovori na takšne antigenske epitope (mikrobni antigen), nastala protitelesa zaradi mimikrije navzkrižno reagirajo tudi z enakimi lastnimi antigenskimi determinantami in tako se sproži avtoimunski odziv (Rottem, 2003).

Fenotipska variabilnost je pri mikroorganizmih posledica antigenske spremenljivosti. Mikroorganizmi spreminjajo površinske komponente z visoko frekvenco. S spreminjanjem antigenkega repertoarja na površini in posledično imunogenosti se mikoplazme uspešno izmikajo imunskemu odzivu. Ker nimajo celične stene, gibalnih organelov ali bičkov, so glavne spreminjajoče površinske molekule lipoproteini (Rottem, 2003).

Kolonizacija in okužba gostitelja je pri večini mikoplazem odvisna od pritrditve na gostiteljske celice. Za pritrditev je najpomembnejši pritrditveni organel na enem od polov bakterije. Najbolje preučena mehanizma pritrditve sta pri *M. pneumoniae* in *M. genitalium*. Najpomembnejši proteini organela *M. pneumoniae* so adhezin P1, P30 ter

pomožni proteini P40, P90, HMW-1 in HMW-3 (Dallo in sod., 1990; Dirksen in sod., 1996; Inamine in sod., 1988; Krause, 1996; Krause in sod., 1982). Odsotnost celične stene omogoča neposreden kontakt med citoplazemsko membrano mikoplazem in gostiteljskimi celicami. V ustreznih razmerah lahko zato pride do zlitja med celicama (Rottem, 2003).

S svojim delovanjem lahko mikoplazme poškodujejo gostiteljske celice na več načinov. Ker mikoplazme same niso zmožne biosinteze aminokislin, maščobnih kislin, kofaktorjev in vitaminov, prevzamejo prekursorje za sintezo od gostitelja. Nefermentirajoče vrste mikoplazem pridobivajo ATP z arginin dihidrolazno potjo in posledično zelo hitro izčrpajo rezerve arginina, to pa vpliva na sintezo proteinov, delitev in rast gostiteljskih celic (Pollack in sod., 1997; Razin in sod., 1998; Rottem in Barile, 1993). Nekateri sevi zaradi izčrpanja arginina preprečijo sintezo histonov, kar povzroča lom kromosomov, multiple translokacije in redukcijo števila kromosomov (McGarrity in sod., 1992).

S pritrditvijo na površino gostiteljevih celic lahko mikoplazme ovirajo dostop do membranskih receptorjev ali pa spremenijo transportne mehanizme gostitelja (Rottem, 2003). Mikoplazme ne sintetizirajo klasičnih bakterijskih toksinov, vendar lahko s toksičnimi metabolnimi produkti (peroksidom in superoksidnimi radikali) in citolitičnimi encimi (fosfolipazami) poškodujejo gostiteljeve celice (Almagor in sod., 1986; Shibata in sod., 1995).

Poškodbe so lahko tudi posledica zlitja mikoplazemskih celic z gostiteljevimi. Z zlitjem se vsebina mikoplazemske celice sprosti v citoplazmo gostiteljske celice in lahko vpliva na normalne funkcije celice. Nukleaze mikoplazem lahko razgradijo DNA evkariontskih celic. Mehanizem zlitja še ni točno poznan (Paddenberg in sod., 1998; Paddenberg in sod., 1996). Pri poškodbi gostiteljskih celic pa so prav tako pomembne

proteaze, hemolizin, nevraminidaze in pri *M. alligatoris* tudi hialuronidaza (Brown in sod., 2004).

2.3 MIKOPLAZME PRI PTICAH

Danes je poznanih 23 vrst mikoplazem, ki okužujejo ptice. Zaradi ekonomske pomembnosti so najbolj raziskane vrste, ki povzročajo bolezni v perutninski industriji. Med njimi so štiri vrste (*M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis* in *M. iowae*), ki so pomembnejši patogeni v perutninarstvu. (Bradbury, 2001). Glavni antigeni teh patogenih vrst so hemaglutinini (Benčina, 2002). Vrsti *M. gallisepticum* in *M. synoviae* sintetizirata nevraminidazo ter se pritrjata na gostiteljske receptorje s sialično kislino (Benčina, 2002; Berčič in sod., 2008). Tudi nekatere druge vrste, ki jih najdemo pri pticah, proizvajajo nevraminidazo (*M. cloacale*, *M. corogypsi*, *M. pullorum*), vendar neposredna povezava s patogenostjo ni potrjena. Sevi patogenih vrst mikoplazem se razlikujejo v tkivnem tropizmu, invazivnosti in patogenosti, vendar dejavniki, ki vodijo v tako raznolikost, v veliki meri niso poznani (Berčič in sod., 2008).

2.3.1 *Mycoplasma corogypsi*

Tipski sev *M. corogypsi* BV1 so leta 1993 izolirali in opisali Panangala in sodelavci. Sev je bil izoliran z ognjka na podplatu črnega jastreba (*Coragyps atratus*) (Panangala in sod., 1993).

Celice nimajo prave celične stene in so pleomorfnih, nepravilnih, podolgovatih ali eliptičnih oblik. *M. corogypsi* je kemoorganotrof, fermentira glukozo, ne razgrajuje arginina in uree. Za rast potrebuje holesterol ali serum (Panangala in sod., 1993).

Na krvnem agarju *M. corogypsi* raste v drobnih kolonijah z α -hemolitično cono okoli njih. Celice *M. corogypsi* se po Gramu obarvajo blede rožnato in se združujejo v skupke brez določene oblike. Celice *M. corogypsi* se vežejo na kokošje, prašičje, človeške in ovčje eritrocite in povzročajo hemaglutinacijo. Delež GC baznih parov je 28 mol% (Panangala in sod., 1993).

Filogenetsko se *M. corogypsi* uvršča v skupino hominis (v razredu *Mollicutes*) in v gručo *M. synoviae* (Johansson in Pettersson, 2002).

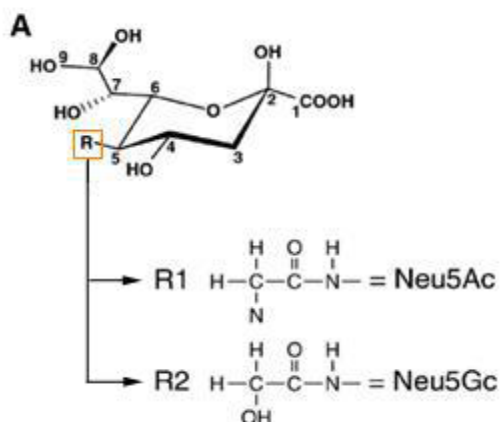
2.4 SIALIČNA KISLINA

Mnoge celice, tako evkariontske kot prokariontske, imajo na svoji površini glikokonjugate, ki igrajo pomembno vlogo v mnogih bioloških procesih. Glikokonjugati sodelujejo pri prepoznavanju med celicami ter med celicami in majhnimi molekulami. Sialična kislina ima negativen naboj in navadno zavzema končno pozicijo na glikokonjugatih evkariontov, izpostavljenih na celični površini (Severi in sod., 2007; Schauer, 2000). Prav zaradi izpostavljenosti ima več pomembnih funkcij: med drugimi zaradi naboja stabilizira glikokonjugate in celično membrano, sodeluje pri komunikaciji med celicami kot kemični mediator, regulira funkcijo transmembranskih receptorjev, vpliva na transport skozi membrano, ščiti celice pred lastnim imunskim odgovorom in mnoge druge (Vimr in sod., 2004; Schauer, 2000).

2.4.1 Struktura sialične kisline

Sialična kislina (tudi nevraminska kislina) je pojem, ki opisuje družino več kot 40 podobnih monosaharidov z 9 ogljikovimi atomi. Vse oblike izhajajo iz 2-keto–3-deoksi–5-acetamido–D-glicero–D-galakto nonulosonske kisline. Posebnost v strukturi je aminska skupina na poziciji 5 in karboksilna skupina na poziciji 1, ti skupini dajeta v fizioloških razmerah molekuli negativni naboj (Vimr in sod., 2004; Traving in Schauer,

1998). V naravi sta najpogostejši obliki sialične kisline N-acetilnevraminska kislina in N-glikolilnevraminska kislina, ki se med seboj razlikujeta na poziciji 5 (C5) sladkornega obroča (slika 1) (Vimr in sod., 2004).



Slika 1: Struktura N-acetilnevraminske kisline (Neu5Ac) in N-glikolilnevraminske kisline (Neu5Gc) (Vimr in sod., 2004: 133).

Modifikacije sialične kisline so odvisne od organizma ter od pozicije glede na celico ali molekulo, na katero je pripeta. Poleg modifikacij z N-acetil in N-glikolil na C5 mestu sladkornega obroča so pogoste tudi modifikacije z acetilacijo hidrosilnih skupin na pozicijah C4, C7, C8 in C9. Nekoliko manj pogoste pa so modifikacije z laktilnimi, sulfhidrilnimi in metilnimi skupinami (Traving in Schauer, 1998; Vimr in sod., 2004).

Sialična kislina najpogosteje zaseda končno pozicijo na glikanski verigi. Pripeta je preko drugega ogljikovega atoma na tretji ali šesti atom ogljika predhodnega sladkorja ali pa na pozicijo 8, če je predhodni sladkor sialična kislina. V bakterijskih kapsulah in v gangliozidih višjih živali jo najdemo tudi znotraj glikanske verige (Traving in Schauer, 1998). Vezana je na sladkorje (oligosaharide in polisaharide), običajno pa je del glikolipidov in lipoproteinov, ki jih s skupnim imenom poimenujemo sialoglikokonjugati (Vimr in sod., 2004).

Pri organizmih naddebla *Deuterostomia* (vretenčarji, kozolnjaki in iglokožci) najdemo štiri glavne tipe glikokonjugatov: glikozilfosfatidilinozitolna sidra, glikoproteine, glikolipide in proteoglikane. Sialična kislina je največkrat končni del glikoproteinov in glikolipidov. Glikokonjugati bakterij so kapsularni polisaharidi (K-antigeni), lipopolisaharidi (O-antigeni), glikoproteini S-sloja in peptidoglikani. Sialična kislina je največkrat del kapsularnih polisaharidov in lipopolisaharidov, vendar pa ni pripeta na končni del kompleksa (Angata in Varki, 2002). Sialična kislina in sorodni nonulosonati so edina oblika sladkorjev z 9 ogljikovimi atomi, ki jih najdemo pri prokariontih (Vimr in sod., 2004).

2.4.2 Pomen sialične kisline za bakterije

Sialično kislino bakterije uporabljajo v različne namene. Pomembna je pri kolonizaciji gostitelja, obstanku patogena v gostitelju ter povzročanju bolezni (Severi in sod., 2007). Nekateri mikroorganizmi (kot npr. *Escherichia coli* in *Haemophilus influenzae*) imajo metabolne poti, s katerimi lahko uporabijo sialično kislino kot vir ogljika, dušika in energije ter kot prekursor za sintezo celične stene. N-acetilnevraminat aldolaza N-acetilnevraminsko kislino cepi v N-acetilmanozamin in piruvat. Bakterija nato pretvori N-acetilmanozamin v amonijak in fruktozo-6-fosfat, ki vstopi v centralni metabolizem (Vimr in sod., 2004; Severi in sod., 2005). Kako bakterija vzdržuje ravnotežje med katabolnimi in anabolnimi potmi, ni znano, so pa pri *H. influenzae* našli dokaze tekmovanja za uporabo sialične kisline med katabolno potjo in sialilacijo lipopolisaharidov (Vimr in sod., 2000).

Pogostost sialične kisline v živalskem svetu lahko nekateri mikroorganizmi izkoristijo kot potencialni signal za zaznavanje okolja v gostitelju (Vimr in sod., 2004). Nekatere vrste mikoplazem uporabljajo sialoglikokonjugate kot receptorje za vezavo na gostiteljsko celico (Roberts in sod., 1989).

Sialokonjugati so prevladujoče komponente celičnih površin sesalcev, zato nekateri mikroorganizmi, ki živijo v stiku z njimi, vključijo sialično kislino v lipopolisaharide ali kapsule in s tem skrijejo lastne antigenske površine ter se tako izmaknejo gostiteljevemu imunskemu odzivu (Harvey in sod., 2001; Vimr in sod., 2004).

2.4.3 Načini pridobivanja sialične kisline pri mikroorganizmih

Pri bakterijah poznamo dve glavni poti pridobivanja sialične kisline: z *de novo* biosintezo ter pridobivanje iz okolja (Severi in sod., 2007).

De novo biosintezo med številnimi drugimi uporabljajo tudi bakterije *Escherichia coli* K1, *Neisseria meningitidis* in *Campylobacter jejuni*. Prekurzor za *de novo* biosintezo sialične kisline je UDP-N-acetilglukozamin, ki ga sintetizira večina bakterij, saj ga potrebujejo pri sintezi celične stene. Encim UDP N-acetilglukozamin 2-epimeraza pretvori prekurzor v N-acetilmanozamin, ki se v reakciji kondenzacije s fosfoenolpiruvatom pretvori v N-acetilnevraminsko kislino. Reakcijo katalizira sintaza N-acetilnevraminske kisline. Po končani sintezi sintetaza aktivira sialično kislino v citidinmonofosfat (CMP)-N-acetilnevraminsko kislino. Šele nato se lahko sialična kislina veže na znotrajcelično sialil transferazo, ki jo prenese na ustrezno komponento površine patogene bakterije (Vimr in sod., 2004).

Drugi vir sialične kisline za mikroorganizme je okolje. Mnogo patogenih mikroorganizmov sprošča sialidaze, ki cepijo sialično kislino z različnih sialoglikokonjugatov gostiteljev. Nekateri mikroorganizmi izkoriščajo sialično kislino iz okolja, a sami ne proizvajajo sialidaz (npr. *Haemophilus influenzae*). Predvideva se, da ti mikroorganizmi pridobijo sialično kislino s pomočjo sialidaz drugih bakterij živečih v istem okolju ali s pomočjo sialidaz gostitelja, ki se sprostijo ob vnetju.

Sproščeno sialično kislino nato bakterije s pomočjo specifičnih transporterjev prenesejo v celico, kjer jo s sialiltransferazo aktivirajo in prenesejo na lipopolisaharidni sloj. Celoten kompleks se prenese skozi membrano na zunanjo stran celice (Severi in sod., 2007). Izjema je *Neisseria gonorrhoeae*, ki izkorišča gostiteljevo že aktivirano CMP-N-acetilnevraminsko kislino. Na zunanjo membrano ima bakterija vezano zunajcelično sialiltransferazo, zato se prenos na LPS zgodi brez transporta v celico (Shell in sod., 2002).

2.5 NEVRAMINIDAZA

Nevraminidaza (sialidaza, N-acilnevraminozil glikohidrolaza, EC 3.2.1.18) je ekso-glukozidaza, ki hidrolizira α -glikozidno vez med sialično kislino, ki je navadno pripeta kot končni sladkor na glikoproteine, glikolipide ali oligosaharide pri višjih živalih in pri nekaterih mikroorganizmih. Nekaterne nevraminidaze kažejo široko specifičnost in hidrolizirajo različne tipe glikozidnih vezi, druge delujejo ozko specifično in hidrolizirajo le določene tipe glikokonjugatov (Abrashev in Dulguerova, 2000). Nevraminidaze so pogosti encimi pri živalih naddebla Deuterostomia in pri mikroorganizmih, predvsem živalskih patogenih in komenzalnih. Pri mikroorganizmih je nevraminidaza prisotna pri nekaterih glivah, protozojih, bakterijah in virusih (Roggentin in sod., 1993).

2.5.1 Substrati za nevraminidaze

Navadno je substrat za nevraminidazo terminalno vezana sialična kislina sialoglikokonjugatov gostiteljskih celic. Glede na substituenta na mestih 4, 5, 7, 8 in 9, je poznanih več kot 30 variacij sialične kisline. Pri organizmih naddebla Deuterostomia je sialična kislina navadno vezana z α (2-3) ali α (2-6) glikozidno vezjo na oligosaharide, glikoproteine in glikolipide, α (2-8) vezi pa so prisotne pri gangliozidih in glikoproteinih. Največ bakterijskih nevraminidaz preferenčno cepi

sialično kislino, ki je na glikokonjugate vezana z α (2-3) vezjo in jo večinoma najdemo pri živalih. Zanimivo je, da nevraminidaze z nizko molekulsko maso (*Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii* in *Salmonella typhimurium*) hidrolizirajo le omejeno število substratov in imajo veliko preferenco za cepljenje α (2-3) vezi, medtem ko encimi z večjo molekulsko maso cepijo večino naravnih substratov (Roggentin in sod., 1993).

2.5.2 Geni za nevraminidaze in primarna struktura encima

Zapis za nevraminidazo je pri večini bakterij v genih *nan*. Ti so del večjega inducibilnega operona, ki se odziva na prisotnost sialične kisline v okolju (Roggentin in sod., 1993; Vimr in sod., 2004).

V primarni strukturi nevraminidaz se pojavljata dva ohranjena motiva. Prvi motiv je 'Asp box', ki predstavlja razpored aminokislin S-X-D-X-G-X-T-W in se v sekvenci ponovi štirikrat do petkrat (Roggentin in sod., 1993; Schauer, 2000). Pri virusnih nevraminidazah se 'Asp box' ponovi enkrat ali dvakrat ali je celo odsoten. Drugi motiv, 'FRIP', leži na N-terminalnem koncu encima in ima zaporedje X-R-X-P. Motiv 'FRIP' najverjetneje sodeluje pri vezavi na substratno molekulo, medtem ko naj bi motivi 'Asp box' imeli vlogo v strukturi encima (Schauer, 2000).

Ohranjenost nekaterih motivov v genskih zapisih nevraminidaz iz različnih organizmov (evkariontskih in prokariontskih) kažejo, da nekatere skupine nevraminidaz izhajajo iz skupnega prednika. Med organizmi je najverjetneje prišlo do horizontalnih genskih prenosov, pri katerih so morda imeli pomembno vlogo bakteriofagi (Schauer, 2000).

2.5.3 Tipi in molekulske mase nevraminidaz

Nevraminidazo nekateri mikroorganizmi sproščajo v medij, pri drugih je vezana na površino celic, pri nekaterih pa se nahaja v intracelularnem prostoru (Roggentin in sod., 1993).

Molekulske mase nevraminidaz se med seboj zelo razlikujejo, večina je velikih od 40 kDa do 150 kDa. Večina mikroorganizmov sintetizira nevraminidaze kot monomere, nekatere izjeme pa kot dimere in trimere. Nevraminidaze, ki jih sestavlja več podenot, imajo večje molekulske mase (tudi več kot 350 kDa) (Roggentin in sod., 1993; Abrashev in Dulguerova, 2000).

2.5.4 Optimalni pH in temperatura, vpliv kalcijevih ionov

Optimalni pH za delovanje bakterijskih nevraminidaz je med 5,0 in 7,0. Temperaturni optimum za večino nevraminidaz je med 35 °C in 40 °C (Abrashev in Dulguerova, 2000). Nevraminidaze iz nekaterih nepatogenih vrst bakterij imajo temperaturni optimum med 50 °C in 58 °C (Uchida in sod., 1979; Aisaka in sod., 1991). Nevraminidaze, ki jih proizvajajo nekatere vrste iz rodov *Clostridium*, *Vibrio*, *Streptococcus* in *Corynebacterium*, za svoje delovanje nujno potrebujejo prisotnost kalcijevih ionov. Na delovanje nevraminidaz drugih vrst, iz istih in tudi drugih rodov, pa kalcijevi ioni iz okolja nimajo vpliva. Verjetna vzroka neobčutljivosti na kalcijeve ione v okolju sta dva: kalcijevi ioni so vezani na membrano s sialoglikokonugati ali pa je prisotna izmenjava in permeabilnost ionov v mikrobnih celicah (Abrashev in Dulguerova, 2000; Uchida in sod., 1979).

Nevraminidaza iz pasje mikoplazme *M. canis* ima najvišjo aktivnost pri pH 9, dodatek kalcijevih ionov v raztopino, pa reakcije nekoliko pospeši. Temperaturna inaktivacija je popolna pri 55 °C (Zakrajšek, 2008). Nasprotno pa ima nevraminidaza iz *M. gallisepticum* optimalni pH delovanja v kislem in sicer pri pH 5,8. Kalcijevi ioni v raztopini močno zvišajo njeno aktivnost, temperaturna inaktivacija pa se zgodi pri 70 °C (Sethi in Müller, 1972).

2.5.5 Vloga nevraminidaz pri bakterijah

Med sorodnimi vrstami bakterij, in celo med sevi iste vrste, so velike razlike v sposobnosti proizvodnje nevraminidaze. Večina bakterij, ki proizvajajo nevraminidazo, je v tesnem stiku z živalmi kot komenzali ali patogeni. Nevraminidaza ima pri nekaterih bakterijah dokazano vlogo v patogenezi, vendar je njena vloga tudi pridobivanje hranil. (Roggentin in sod., 1993). Pri bakterijah se večina sialične kisline, pridobljene z encimsko odcepitvijo, uporabi kot vir energije in ogljika (Schauer, 2000). Ker nevraminidazo proizvaja veliko patogenih mikroorganizmov, se predvideva, da ima pomembno vlogo kot virulenčni faktor ali da pomaga mikroorganizmu pri širjenju v gostitelju (Gabriel in sod., 1984, cit. po Abrashev in Dulguerova, 2000; Ezepechuk in sod., 1974, cit. po Abrashev in Dulguerova, 2000). Nevraminidaze spremenijo strukturo celične membrane in posledično pride do spremembe v celični fiziologiji in v aktivnem transportu kationov. Te spremembe vodijo do povečane fagocitoze, indukcije hemaglutinacije in zmanjšanja agregacije celic (Weiss in sod., 1969, cit. po Abrashev in Dulguerova, 2000; Gesner in Thomas, 1966, cit. po Abrashev in Dulguerova, 2000; Kemp, 1986, cit. po Abrashev in Dulguerova, 2000).

S sialično kislino na membranskih komponentah so celice gostitelja zaščitene pred lastnim imunskim sistemom. Z odcepom sialične kisline, gostiteljev imunski sistem prepozna lastne celice kot tujek, kar vodi do avtoimunskih bolezni. (Kahane in sod., 1990; Schauer, 2000). Na drugi strani pa nekateri mikroorganizmi odcepljeno sialično kislino uporabijo za izogibanje imunskemu sistemu gostitelja z vgradnjo sialične kisline v lastno celično membrano (Severi in sod., 2005).

Nevraminidaza ima vlogo tudi pri depolimerizaciji. Sialilirani oligosaharidi, glikoproteini, glikolipidi in gangliozi so zaščiteni pred hidrolitično razgradnjo. Zato ti

po odcepitvi sialične kisline postanejo tarča za razgradnjo z različnimi encimi, depolimeriziran zunajcelični matriks pa ne opravlja funkcije rezervoarja citokinov in encimov vpletenih v signalno transdukcijo (Ernst in sod., 1995). Permeabilnost vezivnega tkiva se poveča in zmanjša se viskoznost telesnih tekočin, kar omogoča lažje širjenje bakterij in tesnejši kontakt z gostiteljskimi celicami (Ponnuraj in Jedrzejak, 2000). Bakterije z depolimerizacijo zunajceličnega matriksa pridobijo tudi hranila (Roggentin in sod., 1988).

2.5.6 Nevraminidaze pri mikoplazmah

Nevraminidazno aktivnost so potrdili pri mikoplazmah, ki jih najdemo pri pticah in perutnini: *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis*, *M. iowae* in *M. corogypsi*. Šibka aktivnost je potrjena tudi pri *M. anseris*, *M. cloacale* in *M. pullorum* (Berčič in sod., 2008; May in Brown, 2008). Potrjena je tudi aktivnost pri *M. alligatoris*, ki je patogena za aligatorje ter pri *M. canis*, *M. cynos* in *M. malare*, ki okužujejo pse (Brown in sod., 2004; May in Brown, 2008).

Vse trenutno potrjene vrste mikoplazem, ki proizvajajo sialidaze, pripadajo filogenetski gruči *M. synoviae* ali imajo skupnega gostitelja z enim ali z več sevi iz omenjene gruče (May in Brown, 2008).

Zanimivo je, da si *M. gallisepticum* in *M. synoviae* delita gene, ki domnevno kodirajo nevraminidazo (Papazisi in sod., 2003; Vasconcelos in sod., 2005). Podatki kažejo, da gen NanH (MS0199) kodira nevraminidazo veliko približno 110 kDa, ki ima potrjeno nevraminidazno aktivnost (Vasconcelos in sod., 2005; Berčič in sod. 2008). Kažejo pa se velike razlike v nevraminidazni aktivnosti med različnimi sevi iste vrste pri *M. gallisepticum* in *M. synoviae*. Aktivnost varira od močne do nične znotraj iste vrste (Berčič in sod., 2008).

3 METODE IN MATERIALI

3.1 GOJENJE KULTURE *Mycoplasma corogypsi*

Bakterijsko kulturo *M. corogypsi*, s katero smo izvedli vse teste, sem dobila od dr. Dušana Benčine, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živalorejo.

Kulturo *M. corogypsi* smo gojili v dveh gojiščih: v modificiranem mediju po Frey-u, ki je vseboval 10 % prašičjega seruma, 0,1 % nikotinamid adenin dinukleotida (NAD) in 0,1 % cistein hidroklorida ter v modificiranem mediju po Frey-u z 10% konjskim serumom brez NAD. Kulturo smo inkubirali pri 37–38 °C do pozne logaritemske faze (Berčič in sod., 2008). Nato smo pripravili vzorce za testiranje nevraminidazne aktivnosti, kot je opisano v nadaljevanju.

Kulturi smo določili število enot, ki tvorijo kolonije (CFU/ml; colony forming units). Na petrijevko z agarškim gojiščem smo nacepili 25 µl 1000-krat redčene kulture. Ker so kolonije zelo majhne in slabo vidne s prostim očesom, smo po nekaj dneh inkubacije število kolonij prešteli z mikroskopom pri 40-kratni povečavi in izračunali število CFU.

3.2 PRIPRAVA VZORCEV ZA DOLOČANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI

Nevraminidazno aktivnost smo preverjali v suspenziji s centrifugiranjem skoncentriranih celic kulture *M. corogypsi*, v lizatu kulture, v supernatantu po centrifugiranju ter v filtriranem supernatantu.

3.2.1 Priprava supernatanta in skoncentriranih celic kulture *M. corogypsi*

Tekočo kulturo *M. corogypsi* smo centrifugirali v centrifugi RC5C Sorvall Instruments, Du Pont (rotor GSA) 20 min pri 12000 obr./min (23,424×g). Supernatant smo previdno odstranili ter ga shranili. Usedlino smo resuspendirali v fosfatnem pufru (pH 7,2) v tolikšnem volumnu, da smo celice 1000-kratno skoncentrirali glede na začetni volumen kulture (običajno 100 mL ali 200 mL). Supernatant in skoncentrirane celice smo do nadaljnjih testov shranili pri -20°C. Supernatant in celice smo za določitev nevraminidazne aktivnosti redčili v fosfatnem pufru v dvojnih redčitvah.

3.2.2 Priprava lizata celic *M. corogypsi*

Vzorci lizata celic *M. corogypsi* smo pripravili s postopkom osmotske lize in cikli zamrzovanja in odmrzovanja. Membransko frakcijo (MF) in celično vsebino (CV) celic *M. corogypsi* smo ločili tako, da smo 50 µl skoncentriranih celic dodali 950 µl dvojno destilirane vode. Vzorec smo zamrznili na -85 °C, nato pa ga segreli na 37 °C. Postopek smo ponovili trikrat. Po končani lizi smo vzorec centrifugirali v ultracentrifugi Beckman (rotor TLA 100), 30 min pri 30000 obr./min. Supernatant (vzorec CV) smo ločili od usedline ter ga shranili, usedlino (vzorec MF) pa smo resuspendirali v 50 µl fosfatnega pufra (pH 7,2). Tako pripravljene vzorce smo shranili na -20 °C. Zaradi primerjave aktivnosti vzorcev CV in MF, smo pred uporabo vzorce MF še dodatno redčili, da smo dobili enako redčitev, kot je bila v vzorcu CV, in sicer 1 : 20. Za kontrolo smo uporabili vzorec skoncentriranih celic, le da smo mu namesto dvojno destilirane vode, dodali enak volumen fosfatnega pufra. Ta vzorec nam je služil za primerjavo motnosti. Lizo celic namreč zaznamo kot zbistritev vzorca.

3.2.3 Priprava filtrata iz supernatanta kulture *M. corogypsi*

Supernatant smo filtrirali z namenom, da potrdimo, da je nevraminidaza sproščena v gojišče in ni vezana na celice. Kulturo smo centrifugirali, kot je opisano, nato pa smo njen supernatant z uporabo brizgalke prefiltrirali skozi filter s premerom por 0,2 μm (Acrodisc Syringe Filter, Pall, ZDA). S tako filtracijo iz suspenzije odstranimo vse bakterijske celice, proteinske molekule pa skozi filter prehajajo. V filtratu smo nato izmerili nevraminidazno aktivnost ter jo primerjali z aktivnostjo v nefiltriranem supernatantu.

3.3 DOLOČANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI

3.3.1 Določanje nevraminidazne aktivnosti s fluorogenim substratom

Kot fluorogen substrat za določanje nevraminidazne aktivnosti smo uporabili 2'-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilnevraminsko kislino (MUAN, Sigma, M8639). Nevraminidaza katalizira hidrolizo substrata v N-acetilnevraminsko kislino in 4-metilumbeliferon. Encimsko aktivnost merimo s pomočjo fluorescence 4-metilumbeliferona pri 450 nm. Intenziteta fluorescence je premosorazmerna s aktivnostjo encima. Maksimum vzbujevalne svetlobe je 315–374 nm, fluorescentne svetlobe pa 365–450 nm (Potier in sod., 1979).

Nevraminidazno aktivnost smo primerjalno določali v raztopini nevraminidaze *Clostridium perfringens* (Sigma, N2876) z znano koncentracijo [1 mg/ml] in aktivnostjo ($\geq 0,1$ U/ml) ter pri celicah *M. corogypsi*. Vzorce smo pripravili tako, da smo v mikrotiterski plošči pripravili dvojne redčitve v fosfatnem pufri. Vzorce *M. corogypsi* smo redčili do 1 : 64, vzorce *C. perfringens* smo redčili do 1 : 4096. 30 μl primerno redčenega vzorca smo dodali 4,7 μl 0,35 % substrata MUAN. Kot negativno kontrolo

smo uporabili 30 μ l fosfatnega pufru, kateremu smo dodali 4,7 μ l MUAN-a. Približno 5 minut po dodatku substrata smo posneli rezultate.

3.3.2 Določanje nevraminidazne aktivnosti s kromogenim substratom

Kot substrat smo uporabili 5-bromo-4-kloro-3-indolil- α -D-N-acetilnevraminsko kislino (BIN, Sigma, B4666). Po encimski katalizi nastane modro obarvan produkt, ker pride do cepitve terminalne N-acetilnevraminske kisline in oksidacije indola.

Delovna koncentracija substrata BIN je bila 1 mg/ml, pripravili smo jo iz založne raztopine s koncentracijo 4 mg/ml z redčenjem z dvojno destilirano vodo. Raztopine BIN-a smo hranili v zamrzovalniku pri -20°C.

Aktivnost smo preverjali na mikrotitrskih ploščah ali v mikrocentrifugirkah. Vzorce smo pripravili z dvojnimi redčitvami v fosfatnem pufru do zelene končne redčitve. 30 μ l pripravljene vzorca smo dodali 5 μ l substrata ter beležili čas do pojava modre barve, ki pomeni pozitivno reakcijo.

Kot negativno kontrolo smo uporabili 30 μ l fosfatnega pufru, ki smo mu dodali 5 μ l substrata. Za pozitivno kontrolo smo uporabili nevraminidazo iz klostridija *Clostridium perfringens* (Sigma, N2876) z znano koncentracijo [1 mg/ml] in aktivnostjo ($\geq 0,1$ U/ml), ki smo jo dvojno redčili v fosfatnem pufru in 30 μ l dodali 5 μ l substrata BIN.

Ker se je v danih laboratorijskih razmerah kromogeni substrat BIN izkazal za stabilnejšega in primernejšega za uporabo kot fluorogeni substrat MUAN, smo vse nadaljnje teste aktivnosti opravili z BIN-om.

3.4 TEMPERATURA INAKTIVACIJE NEVRAMINIDAZE

Izgubo nevraminidazne aktivnosti smo preverjali v vzorcu supernatanta kulture *M. corogypsi*. Pripravili smo dvojne redčitve vzorca v fosfatnem pufru. Vzorce smo inkubirali pri temperaturi 45 °C, 50 °C in 55 °C. Vzorce smo pri izbrani temperaturi inkubirali 60 minut. Kot pozitivna kontrola nam je služil enako pripravljen vzorec, inkubiran pri sobni temperaturi. Kot negativna kontrola je služil fosfatni pufer, inkubiran pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo v vzorcih preverili aktivnost nevraminidaze kot je opisano v poglavju 3.3.2 Določanje nevraminidazne aktivnosti s kromogenim substratom.

Pojav modre barve je pomenil, da vzorec v razmerah poskusa, ni izgubil nevraminidazne aktivnosti. Rezultate smo odčitali 1 uro in 24 ur po dodatku substrata.

3.5 DOLOČANJE pH OPTIMUMA IN VPLIVA KALCIJEVIH IONOV NA DELOVANJE NEVRAMINIDAZE

pH optimum in vpliv kalcijevih ionov smo preverjali v celični suspenziji *M. corogypsi*. Vzorec smo redčili s fosfatnim pufrom do redčitve 1 : 4. Po 30 µl tako pripravljenih vzorcev smo v mikrocentrifugirkah centrifugirali 10 minut pri 10000×g (Ependorf centrifuge 5417C). Supernatant smo odstanili ter usedlino celic resuspendirali v 30 µl puфра z ustreznim pH.

V mikrocentrifugirkah smo pripravili dve pH vrsti z različnimi pH vrednostmi, eno brez kalcijevih ionov ter drugo z 10 mM CaCl₂. Razpon pH je bil od 3 do 10 v stopnjah po eno enoto.

Pozitivna kontrola je bila suspenzija celic *M. corogypsi* redčena 1 : 4 v fosfatnem pufru (pH 7,2), negativna kontrola pa fosfatni pufer.

3.6 ELEKTROFOREZA

Elektroforezo smo uporabili za ločevanje proteinov v vzorcih glede na njihovo molekulsko maso. Uporabili smo poliakrilamidno elektroforezo z natrijevim dodecil sulfatom (SDS PAGE). Elektroforezo smo izvedli na poliakrilamidnih nosilcih s primerno zamreženostjo za vzorec, ki smo ga želeli ločiti.

3.6.1 Priprava vzorcev

Vzorci, ki smo jih ločili z elektroforezo, so bili celični lizati in frakcije, pridobljene po gelski kromatografiji. Vzorce smo redčili v 5% natrijevem dodecil sulfatu (sodium dodecyl sulfate; SDS), tako da je bila končna koncentracija SDS v vzorcu 2,5 %.

Vzorce smo na elektroforezni gel nanašali v reducirajočem nanašalnem pufri s 5% β -merkaptetoetanolom ter v nereducirajočem nanašalnem pufri s 5% fosfatnim pufrom. Razmerje med volumnom vzorca in nanašalnega pufra je bilo 3 : 2. Volumen, ki smo ga nanесли na gel, je pri velikem gelu znašal 60 μ l, pri malem gelu pa 24 μ l.

3.6.2 Referenčni markerji

S pomočjo referenčnih markerjev za molekulske mase lahko določimo relativno molekulsko maso proteinov v vzorcu. Uporabili smo že pripravljeno mešanico 10 referenčnih markerjev z molekulskimi masami 170 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 56 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 26 kDa, 17 kDa in 11 kDa (Fermentas, Page RulerTM Prestained Protein Ladder, SM0671). V eno stezo na SDS PAGE gelu smo nanесли 10 μ l mešanice referenčnih markerjev.

3.6.3 Parametri in potek elektroforeze

Proteine v vzorcih smo ločevali v poliakrilamidnem gelu, ločevalni gel je bil z 8%, razvijalni gel pa s 4% poliakrilamidom. Med stekleni plošči smo najprej vlili ločevalni gel ter ga prekrili z vodo nasičenim n-butanolom. Počakali smo, da se je gel strdil, nato smo n-butanol odlili, površino sprali z destilitano vodo ter jo osušili s filter papirjem. Čez ločevalni gel smo nalili razvijalni gel ter vanj namestili glavnik ter počakali, da se gel strdi.

Preglednica 2: Sestava 8% ločevalnega gela za SDS PAGE elektroforezo.

8% ločevalni gel	7,5 ml	30 ml
H ₂ O	3,45 ml	13,9 ml
30% akrilamid/bis-akrilamid	2 ml	8 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2 ml	7,5 ml
10% SDS	100 µl	300 µl
10% APS	100 µl	300 µl
TEMED	5 µl	18 µl

Preglednica 3: Sestava 4% razvijalnega gela za SDS PAGE elektroforezo.

4% razvijalni gel	4 ml	15 ml
H ₂ O	2,2 ml	8,35 ml
30% akrilamid/bis-akrilamid	670 µl	2,53 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	1 ml	3,76 ml
10% SDS	40 µl	150 µl
10% APS	40 µl	150 µl
TEMED	4 µl	15 µl

Elektroforeza je potekala v elektroforetskem pufru (3 g/l Tris, 14,4 g/l glicin, 1g/l SDS z umerjenim pH 8,3) pri 100 mA in 80 V v razvijalnem gelu (približno pol ure) in pri 100 mA in 120 V v ločevalnem gelu (približno 4 ure).

3.6.4 Barvanje elektroforeznega gela

Da postanejo proteini, ki so se ločili v elektroforeznem gelu, vidni, moramo gel barvati. Barvilo smo pripravili iz 125 ml metanola, 125 ml destilirane vode in 0,25 g Coomassie Brilliant Blue barvila s koncentracijo 1,1 mg/ml (Sigma, B0149). Tik pred uporabo smo mešanici dodali še očetno kislino do končne koncentracije 10 %. Gel smo ob rahlem mešanju barvali toliko časa, da je povsem pomodrel, nato pa smo ga razbarvali z raztopino za razbarvanje (metanol in destilirana voda v razmerju 1 : 17,5, tik pred uporabo pa smo dodali še očetno kislino do koncentracije 7,5 %).

3.7 PRENOS PROTEINOV Z ELEKTROFOREZNEGA GELA NA MEMBRANO

Z neobarvanega dela elektroforeznega gela smo prenesli proteine na membrano Immobilone P PVDF (poliviniliden fluorid) (Millipore, ZDA). Na katodno ploščo smo položili dve blaznici ter štiri filter papirje enake dimenzije, kot je bil gel. Blazinice in filter papirje smo pred tem namočili v pufer za prenos proteinov (pufer EBP: 10 mM 3-cikloheksilamino 1-propansulfonska kislina (CAPS) v 10% metanolu). Ločevalni del gela smo za 5 minut namočili v pufer EBP ter ga nato položili na filter papirje. Čez gel smo položili membrano aktivirano v 100% metanolu. Na membrano smo položili 4 filter papirje in dve blaznici, oboje namočeno v pufer EBP. Pri sestavljanju plasti smo pazili, da med njimi ni ujetih mehurčkov zraka, saj bi ti motili prenos. Čez tako postavljene plasti smo položili anodno ploščo.

Prenos proteinov na membrano je potekal 2 do 2,5 ure. Tok potreben za prenos je odvisen od velikosti gela in ga izračunamo po formuli:

$$\text{površina gela [cm}^2\text{]} \times 0,8 \text{ mA}$$

Po končanem prenosu smo membrano sprali v destilirani vodi ter jo za nekaj sekund pomočili v 100% metanol. Membrano smo nato barvali v barvilu Coomassie brilliant blue R-250 (Pharmacia, ZDA) do intenzivne modre barve. Po barvanju smo membrano razbarvali v 50% metanolu ter jo na koncu sprali v destilirani vodi. Tako smo dobili odtis proteinov, ki je bil enak tistim v elektroforeznem gelu.

Za ugotavljanje prisotnosti nevraminidazne aktivnosti na membrani smo polovico membrane barvali, kot je opisano, drugo polovico pa smo po prenosu sprali v destilirani vodi in nanjo nanесли substrat BIN. Pojav modre barve pokaže položaj in velikost encima z nevraminidazno aktivnostjo.

3.8 PREVERJANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI NA MEMBRANI

Pri določanju nevraminidazne aktivnosti na poliviniliden fluoridni membrani po prenosu z elektroforeznega gela smo imeli nekaj težav, zato smo pripravili test, s katerim smo preverili, ali vezava nevraminidaze na blokirano oz. neblokirano membrano vpliva na izgubo aktivnosti.

Pri testu smo uporabili enako membrano, kot smo jo uporabili za prenos z gela. Membrano smo odrezali na dva trakova dolga 3,5 cm in široka 0,5 cm. Na vsak trak smo narisali kvadratke velike 0,5 x 0,5 cm². Trakova smo aktivirali tako, da smo ju za 2 sekundi pomočili v 100% metanol ter sprali v destilirani vodi. Na vsak kvadrateg smo nanесли 3 µl frakcije št. 120 dobljene po gelski kromatografiji in počakali, da se vzorci posušijo. Nato smo en trak blokirali v 0,5% Tween PBS 30 minut in počakali,

da se posuši. Drugega traku nismo blokirali. Membrani smo prelili s substratom BIN in čez 1 uro odčitali rezultate.

3.9 ELEKTROELUCIJA PROTEINOV IZ ELEKTROFOREZNEGA GELA

Z elektroelucijo lahko s pomočjo električne napetosti iz zelene proteinske lise na elektroforeznem gelu pridobimo protein v topni obliki.

HSB ELUTOR (Biometra biomedizinsche Analytic GmbH, Göttingen) smo napolnili z elucijskim pufrom in v jamice dodali koščke gela. V V-kapilare smo previdno dodali elucijski pufer z visoko vsebnostjo soli in aparat priklopili na napetost 100 V. Elektroelucijo smo pustili teči dvakrat 30 minut. Po vsakem ciklu smo iz V-kapilar prenesli vzorce v mikrocentrifugirko.

Elektroelucijo smo izvedli s koščki gela po elektroforezi celičnega lizata. Eno stezo gela smo obarvali, iz ostalih stez smo glede na položaj lis na obarvani stezi izrezali šest proteinskih lis velikosti od 95 kDa do 130 kDa. Volumen eluatov po vsakem ciklu je znašal približno 120 μ l.

V eluatih smo nato preverjali nevraminidazno aktivnost in ponovno izvedli elektroforezo. Po dodatku substrata BIN [1 mg/ml] v nobenem vzorcu nismo potrdili nevraminidazne aktivnosti. Predvidevali smo, da nevraminidazno aktivnost moti prisotnost SDS in pufer z visoko koncentracijo soli. Zato smo preverili še nevraminidazno aktivnost eluatov na membrani. Da bi zagotovili popolno odstranitev motečih dejavnikov, smo membrano spirali dva dni v fosfatnem pufru in nato preverili nevraminidazno aktivnost s substratom BIN [1 mg/ml].

Preglednica 4: Sestava pufrov za elektroelucijo.

Elucijski pufer	1 l	Elucijski pufer z visoko vsebnostjo soli	100 ml
50 mM Tris	6,057g	NaCl	5,844g
50 mM glicin	3,754g	dopolnimo z elucijskim pufrom	do 100 ml
0,1% SDS	1,000g		
dopolnimo z dH ₂ O	do 1l		
umerimo pH na 8.9 z 37% HCl			

3.10 OBARJANJE PROTEINOV V SUPERNATANTU Z NASIČENIM AMONIJEVIM SULFATOM

Obarjanje z amonijevim sulfatom ((NH₄)₂SO₄) smo uporabili za izolacijo proteinov iz supernatanta suspenzijske kulture *M. corogypsi*.

Obarjanje z amonijevim sulfatom je metoda za izolacijo proteinov iz raztopin. Ioni amonija in sulfata v vodni raztopini tvorijo ionske vezi z molekulami vode. V višjih koncentracijah ti ioni izpodrivajo vodo vezano na proteine, ti se zato z obarjanjem izločijo iz raztopine.

Odločili smo se za obarjanjev treh stopnjah, kjer je bila končna koncentracija amonijevega sulfata 30 %, 50 % in 70 %.

50 ml supernatanta smo prenesli v čašo z magnetnim mešalom in jo postavili na magnetni mešalnik. Pri sobni temperaturi smo med stalnim mešanjem počasi dodajali 21,4 ml nasičenega amonijevega sulfata do končne koncentracije 30 %. Čašo smo nato preko noči postavili v hladilnik (4 °C). Naslednji dan smo vzorec centrifugirali 30 minut pri 3000 g (Sigma 3K 18). Supernatant smo previdno odlili in ga shranili za nadaljnjo obarjanje, usedlino pa smo resuspendirali v 1 ml fosfatnega pufra.

V nadaljevanju smo proteine v supernatantu obarjali do 50% zasičenja z amonijevim sulfatom: 68 ml supernatanta s 30% koncentracijo amonijevega sulfata smo počasi dodajali 27,2 ml nasičenega amonijevega sulfata. Postopek smo nadaljevali, kot je opisano zgoraj.

Na koncu smo obarjali do 70% zasičenja: 92 ml supernatanta s 50% koncentracijo amonijevega sulfata smo počasi dodajali 61,3 ml nasičenega amonijevega sulfata. Postopek smo nadaljevali kot je opisano zgoraj.

Po obarjanju smo v peletu in supernatantu preverili nevraminidazno aktivnost. Rezultat smo odčitali po 1 uri. Oborine z visoko nevraminidazno aktivnostjo smo ločili z elektroforezo SDS PAGE.

3.11 GELSKA KROMATOGRAFIJA

Gelska kromatografija je metoda, s katero v poroznem gelu ločujemo molekule po velikosti. Večje molekule skozi gel potujejo hitreje in se iz kolone izločijo pred manjšimi molekulami.

Za ločevanje smo uporabili gel Sephacryl S-200 High Resolution (Sigma, ZDA). Pripravili smo ga po navodilih Sephacryl S-200 High Resolution (GE Healthcare, Švedska).

Volumen kolone je bil 23 oz. 50 ml. Za pripravo smo odpipetirali 1,5-kratni volumen posedenega medija. Medij smo ločili od etanolne raztopine s pomočjo vakuumske črpalke. Nato smo gel spirali s fosfatnim pufrom. Spran gel smo redčili v 2-kratnem volumnu fosfatnega pufra ter ga enakomerno vlili v pripravljeno kolono in počakali, da se je gel usedel. Kolono smo nato še uravnotežili s spiranjem z dvojnimi volumni fosfatnega pufra.

Na vrh kolone smo nanegli vzorec ter kolono spirali s fosfatnim pufrom. Ves čas spiranja smo zbirali frakcije enake volumnu nanesenega vzorca. Frakcijam smo nato pomerili nevraminidazno aktivnost in tiste z najvišjo shranili za nadaljnje postopke.

3.12 PREVERJANJE PRISOTNOSTI PRAŠIČJIH IgG PROTITELES V VZORCU

V vzorcih po obarjanju s 50% amonijevim sulfatom in prečiščenih z gelsko kromatografijo smo zaznali nevraminidazno aktivnost. Po ločitvi z elektroforezo smo ugotovili, da vzorci vsebujejo več različnih proteinov. Zato smo preverili, če so v vzorcih tudi prašičja IgG protitelesa, ki so sicer prisotna v gojišču.

Prisotnost prašičjih IgG protiteles smo preverili z encimsko imunskim testom (DIBA, dot immunoblot assay) (Benčina in sod., 2005).

Na membrano Immobilone P PVDF (poliviniliden fluorid) (Millipore, ZDA) smo narisali kvadratke velikosti 0,5 x 0,5 cm². Membrano smo namočili v 100% metanol za dve sekundi in jo nato sprali v destilirani vodi. V kvadratke smo nanegli po 2 µl vzorcev in pustili, da se posušijo. Membrano smo nato blokirali v 0,5% Tween PBS. Trakove smo nato inkubirali 45 minut v konjugatu z 'rabbit anti pig IgG' (Sigma, A-5670) protitelesi z vezano peroksidazo (redčeno 1:1000). Sledilo je dvakratno spiranje po 10 minut v 0,05% Tween PBS in enkratno spiranje v fosfatnem pufu. Nato smo trakove pomočili v substrat True blue in po razvoju pozitivnega rezultata (modra barva) reakcijo ustavili v destilirani vodi.

3.13 ODSTRANJEVANJE PRAŠIČJIH IgG PROTITELES IZ VZORCA

Ker smo želeli encim nevraminidazo čim bolj očistiti, smo iz vzorcev želeli odstraniti prašičja IgG protitelesa. Za odstranjevanje prašičjih IgG protiteles iz vzorca smo

uporabili gel Concavalin A Sepharose 4B (Sigma, C-9017) in protein G (Sigma, P-2169). Oba imata to lastnost, da nase vežeta imunoglobuline sesalcev, med njimi tudi prašičje IgG.

3.13.1 Odstranjevanje prašičjih IgG protiteles z gelom Concavalin A

Gel Concavalin A smo sprali v enakem volumnu fosfatnega pufru. Uporabili smo 100 μ l posednega in spranega gela, test smo izvedli v mikrocentrifugirkah. Po spiranju smo pufer odstranili ter dodali 100 μ l frakcije, ki je imela močno nevraminidazno aktivnost po gelski kromatografiji (frakcija 120) in že predhodno potrjeno prisotnost prašičjih IgG. Inkubirali smo 30 minut pri sobni temperaturi z rahlim stresanjem, nato pa pustili, da se je gel posedel. Supernatant smo previdno odvzeli ter ga shranili do testa za preverjanje prisotnosti prašičjih IgG protiteles.

3.13.2 Odstranjevanje prašičjih IgG protiteles s proteinom G

Protein G smo centrifugirali 10 minut pri 2000 \times g, supernatant smo odstranili. Približno 50 μ l usednega proteina G smo sprali v 400 μ l fosfatnega pufru ter ponovno centrifugirali in supernatant odstranili. Usednemu proteinu G smo dodali 150 μ l frakcije s potrjeno nevraminidazno aktivnostjo (frakcija 120), dobljeno po gelski kromatografiji. Vzorec smo inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi z rahlim stresanjem. Po inkubaciji smo vzorec ponovno centrifugirali in supernatant shranili do preverjanja prisotnosti prašičjih IgG protiteles.

4 REZULTATI

4.1 NEVRAMINIDAZNA AKTIVNOST *Mycoplasma corogypsi*

Da je nevraminidaza prisotna v celični suspenziji kulture *M. corogypsi*, smo predvidevali na podlagi predhodnih testov. Domnevo smo potrdili s suspenzijo celic in substratom za nevraminidazo BIN. Suspenziji celic smo določili $3,5 \times 10^7$ CFU/ml. Za primerjavo smo postopek ponovili z referenčno nevraminidazo iz bakterije *C. perfringens* (Sigma, N2876) z znano koncentracijo [1 mg/ml] in aktivnostjo ($\geq 0,1$ U/ml).

Preglednica 5: Primerjava nevraminidazne aktivnosti v kulturi *M. corogypsi* in v vzorcu referenčne nevraminidaze *C. perfringens* (Sigma, N2876).

	čas reakcije (min)	redčitev vzorca					
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64
<i>M. corogypsi</i>	60	++	++	+	-	-	-
<i>C. perfringens</i>	60	++	++	++	++	+	-

Rezultat je potrdil domnevo, da je v vzorcu s celicami prisotna nevraminidaza *M. corogypsi*. V nadaljnjih testih smo želeli ugotoviti, ali je nevraminidaza vezana le na celice ali jo le te tudi sproščajo v gojišče.

4.2 DOLOČANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI

Določali smo nevraminidazo v celični usedlini, supernatantu in filtratu, lizatu – membranski in citoplazemski frakciji.

4.2.1 Prisotnost nevraminidaze v celični usedlini

Glej test na strani 34.

4.2.2 Prisotnost nevraminidaze v supernatantu in filtratu supernatanta

Preglednica 6: Primerjava nevraminidazne aktivnosti med supernatantom in filtratom supernatanta kulture *M. corogypsi*.

	čas reakcije (min)	redčitev vzorca			
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16
Supernatant	60	++	++	+	-
Filtrat	60	++	++	+	-

Rezultati kažejo, da ni razlike v nevraminidazni aktivnosti med supernatantom in filtratom le tega. To dokazuje, da kultura *M. corogypsi* sprošča nevraminidazo v okolje, da je nevraminidaza topna in prehaja skozi pore premera 0,2 µm.

4.2.3 Prisotnost nevraminidaze v lizatu celic

Preverili smo aktivnost v usedlini (membranska frakcija, MF) in supernatantu (citoplazemska vsebina, CV), lizata. Obe frakciji smo preverjali v redčitvi 1 : 2.

V usedlini (MF) smo po 60-ih minutah zaznali močno aktivnost, supernatant (CV) pa ni kazal aktivnosti.

4.3 PRIMERJAVA DOLOČANJA NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI S FLUOROGENIM IN KROMOGENIM SUBSTRATOM

4.3.1 Določanje nevraminidazne aktivnosti s fluorogenim substratom MUAN



Slika 2: Določanje nevraminidazne aktivnosti s fluorogenim substratom MUAN. Vrstica A: vzorec referenčne nevraminidaze *C. perfringens* ([1 mg/ml]; Sigma, N2876). Dvojne redčitve od A1 (redčitev 1 : 2) do A12 (redčitev 1 : 4096). Vrstica B: celična kultura *M. corogypsi* v dvojnih redčitvah od B1 (redčitev 1 : 2) do B6 (redčitev 1 : 64). B7-11: prazno, B12: negativna kontrola.

Sliko smo posneli približno po petih minutah od dodatka substrata. Substrat MUAN je bil pri sobni temperaturi zelo neobstoje in je začel razpadati. Na sliki vidimo, da rahlo

fluorescira tudi negativna kontrola. Rezultate je zaradi neobstoynosti substrata težko oceniti.

4.3.2 Določanje nevraminidazne aktivnosti s kromogenim substratom BIN

Preglednica 7: Določanje nevraminidazne aktivnosti s kromogenim substratom BIN.

Nevraminidaza	Razredčitev						
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128
<i>C. perfringens</i>	5 min	5 min	25 min	25 min	65 min	24 h	-
<i>M. corogypsi</i>	10 min	10 min	10 min	30 min	70 min	70 min	/

Negativna kontrola je ostala negativna.

Substrat BIN je bil tudi pri sobni temperaturi obstojen. Pozitivno reakcijo smo zaznali nekoliko kasneje kot z MUAN-om, vendar so bili rezultati testa bolj zanesljivi in ponovljivi. Negativna kontrola je ostala negativna.

4.4 TEMPERATURNA INAKTIVACIJA NEVRAMINIDAZE

Vpliv temperature na aktivnost nevraminidaze v vzorcih supernatanta kulture *M. corogypsi* smo preverili z encimsko razgradnjo substrata BIN. Vzorce smo inkubirali 60 minut pri 45 °C, 50 °C in 55 °C.

Pozitivna kontrola, vzorec inkubiran pri sobni temperaturi (ST), je bila po 20-ih minutah od dodatka BIN-a pozitivna. Negativna kontrola, fosfatni pufer, je bila po 24-ih urah po dodatku substrata negativna.

Vzorec je po uri inkubacije pri 45 °C ohranil nevraminidazno aktivnost. Pozitivna reakcija se je v primerjavi s pozitivno kontrolo razvila 20 minut kasneje, a je bila nato močno pozitivna.

Vzorec, inkubiran pri 50 °C, je bil po eni uri negativen. Rahlo pozitivna reakcija se je razvila šele po 24-ih urah.

Vzorec, inkubiran pri 55 °C, je ostal negativen tudi po 24-ih urah.

Preglednica 8: Temperaturna inaktivacija nevraminidaze.

Temperatura inkubacije	Čas do zaznave pozitivne reakcije	Nevraminidazna aktivnost
Kontrola (ST)	20 minut	/
45 °C	40 minut	znižana
50 °C	24 ur	močno znižana
55 °C	ni aktivnosti v 24 h	neobstoječa

4.5 DOLOČANJE pH OPTIMUMA IN VPLIVA KALCIJEVIH IONOV NA DELOVANJE NEVRAMINIDAZE

Optimalni pH in vpliv kalcijevih ionov na delovanje nevraminidaze smo preverjali s celicami *M. corogypsi*. Celice smo resuspendirali v pufru z ustreznim pH z 10 mM koncentracijo kalcijevih ionov oziroma brez kalcijevih ionov.

Pozitivna kontrola je bila suspenzija celic *M. corogypsi* v fosfatnem pufru, negativna kontrola pa fosfatni pufer.

Preglednica 9: Rezultati inkubacije nevraminidazne aktivnosti celic *M. corogypsi* pri različnih pH vrednostih. Čas inkubacije je bil 5 minut.

pH	3	4	5	6	7	8	9	10
Rezultat (po 10-ih minutah)	Negativno	+	+	+	+	++	++	++

(+ pomeni rahlo pozitivno reakcijo, ++ pomeni močno pozitivno reakcijo.)

Preglednica 10: Rezultati inkubacije nevraminidazne aktivnosti celic *M. corogypsi* pri različnih pH vrednostih z 10 mM koncentracijo CaCl₂. Čas inkubacije je bil 5 minut.

pH	3	4	5	6	7	8	9	10
Rezultat (po 10-ih minutah)	+ (po 30-ih minutah)	+	+	+	+	+	++	++

(+ pomeni rahlo pozitivno reakcijo, ++ pomeni močno pozitivno reakcijo.)

Pozitivna kontrola je po 10-ih minutah postala pozitivna. Negativna kontrola je ostala negativna.

Test je pokazal, da je bila nevraminidazna aktivnost boljša pri višjih pH vrednostih (pH 8–10). Dodatek CaCl₂ je nevraminidazno aktivnost izboljšal pri vrednosti pH 3, pri višjih pH vrednostih pa dodani ioni niso vplivali na izboljšanje nevraminidazne aktivnosti.

4.6 OBARJANJE PROTEINOV V SUPERNATANTU Z NASIČENIM AMONIJEVIM SULFATOM

Z amonijevim sulfatom smo oborili proteine v supernatantu. Obarjali smo jih v treh stopnjah: s 30%, 50% in 70% amonijevim sulfatom.

Preglednica 11: Nevraminidazne aktivnosti v sedimentih (S) in supernatantih (SPN) po precipitaciji proteinov s 30%, 50% in 70% koncentracijo amonijevega sulfata in centrifugiranju. Rezultat odčitano po 1 uri inkubacije s substratom BIN.

	Neredčeno	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16
SPN izhodni	++	++	++	+	+
S 30%	+	+	+	+	+
SPN 30%	+	+	-	-	-
S 50%	++	++	++	++	++
SPN 50%	-	-	-	-	-
S 70%	-	-	-	-	-
SPN 70%	-	-	-	-	-

(+ pomeni rahlo pozitivno reakcijo, ++ pomeni močno pozitivno reakcijo, - pomeni negativno reakcijo.)

Nekaj proteina z nevraminidazno aktivnostjo se je oborilo v 30% raztopini amonijevega sulfata. V 50% raztopini amonijevega sulfata se je oboril ves protein z nevraminidazno aktivnostjo.

4.7 PREVERJANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI FRAKCIJE PO GELSKI KROMATOGRAFIJI PRECIPITATA S 50% AMON SULFATOM

Po gelski kromatografiji so imele najvišjo nevraminidazno aktivnost frakcije od številke 110 do številke 125. Pozitivno reakcijo smo zaznali v 10-ih minutah.

Na Slikah 3 in 4 so predstavljeni rezultati testa, s katerim smo preverili nevraminidazno aktivnost na blokirani oz. neblokirani membrani. Na membrano smo nanесли frakcijo, pridobljeno z gelsko kromatografijo po precipitaciji s 50% amonijevim sulfatom. Frakcijo številka 120 smo nanесли v redčitvah 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64. Negativno kontrolo je predstavljal fosfatni pufer.



Slika 3: Nevraminidazna aktivnost na poliviniliden fluoridni membrani blokirani v 0,5% Tween PBS 30 minut. Zadnji kvadrataek predstavlja negativno kontrolo.



Slika 4: Nevraminidazna aktivnost na neblokirani poliviniliden fluoridni membrani. Zadnji kvadrataek predstavlja negativno kontrolo.

Preglednica 12: Nevraminidazna aktivnost na blokirani in neblokirani poliviniliden fluoridni membrani.

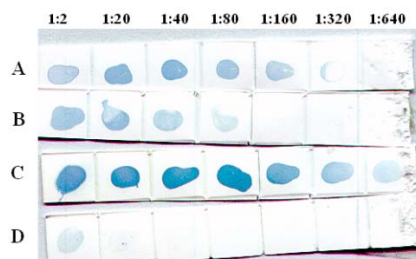
Čas [min] do pojava pozitivne reakcije (+ označuje rahlo pozitivno reakcijo, ++ označuje močno pozitivno reakcijo, - označuje negativen rezultat).

	Redčitev					
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64
Blokirana membrana	15 +	15 +	40 +	-	-	-
Neblokirana membrana	15 ++	15 ++	15 ++	40 +	60 +	60 +

Reakcije so bile manj intenzivne na blokirani membrani. Med postopkom blokiranja membrane z 0,5% Tween PBS se je del proteina verjetno spral z membrane. S testom pa smo potrdili, da se protein veže na blokirano in neblokirano membrano ter pri tem ne izgubi nevraminidazne aktivnosti.

4.8 PREVERJANJE PRISOTNOSTI PRAŠIČJIH IgG PROTITELES V VZORCU

4.8.1 Odstranjevanje prašičjih IgG iz vzorca s Concanavalin A gelom



Slika 5: Test DIBA za preverjanje prisotnosti prašičjih IgG protiteles s konjugiranimi »rabbit anti pig« protitelesi.

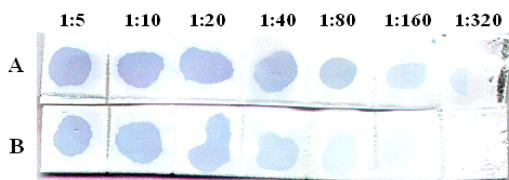
A: Frakcija 120 po gelski kromatografiji.

B: Frakcija 120 očiščena z gelom Concanavalin A Sepharose 4B.

C: 10% prašičji serum.

D: 10% kokošji serum.

4.8.2 Odstranjevanje prašičjih IgG iz vzorca s proteinom G



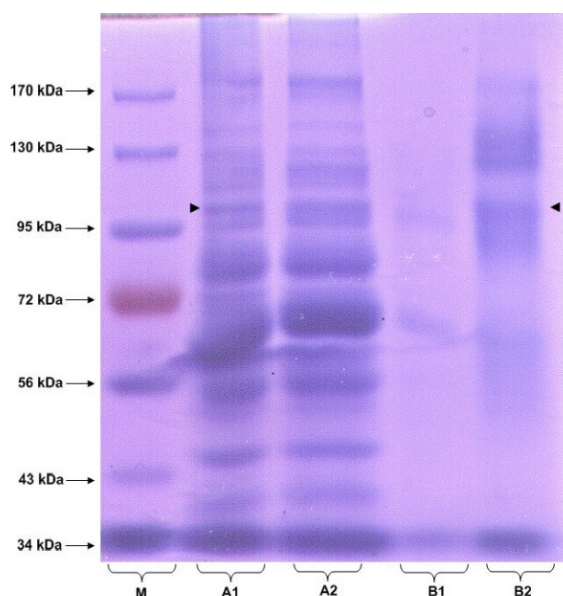
Slika 6: Test DIBA za preverjanje prisotnosti prašičjih IgG protiteles s konjugiranimi rabbit anti pig protitelesi.

A: Frakcija 120 po gelski kromatografiji.

B: Frakcija 120 očiščena s proteinom G.

Z obema metodama smo iz vzorcev odstranili del prašičjih IgG protiteles. Odstranjevanje s Conavalin A gelom je nekoliko uspešnejše (titer 1 : 80) kot odstranjevanje s Protein G sistemom (titer 1 : 160). Nobena od metod pa ne odstrani prašičjih IgG protiteles pri izbranih pogojih v zadovoljivi meri.

4.9 POSKUS IDENTIFIKACIJE NEVRAMINIDAZE V PROTEINSKEM PROFILU *M. corogypsi*



Slika 7: Profil proteinov *M. corogypsi* v gelu po SDS poliakrilamidni elektroforezi. Puščici označujeta protein, ki ustreza nevraminidazi.

M – Proteinski markerji z označenimi molekulskimi masami (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas SM0671).

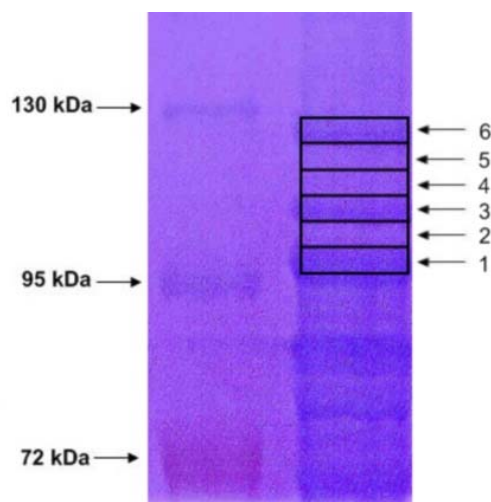
A1 – Suspenzija celic, liziranih s 5% SDS. Vzorcju je namesto β -merkaptetoetnola dodan fosfatni pufer (pH 7,2) (nereducirajoči pogoji). Redčitev celic v nanašalnem vzorcju je 1 : 10.

A2 – Suspenzija celic, liziranih s 5% SDS. Vzorcju je dodan β -merkaptetoetanol (reducirajoči pogoji). Redčitev celic v nanašalnem vzorcju je 1 : 10.

B1 – Frakcija 123 po gelski kromatografiji in očiščena s Concavilin A Sepharose 4B. Redčitev je 1 : 4.

B2 – Frakcija 123 po gelski kromatografiji. Redčitev je 1 : 4.

4.10 ELEKTROELUCIJA PROTEINOV IZ ELEKTROFOREZNEGA GELA



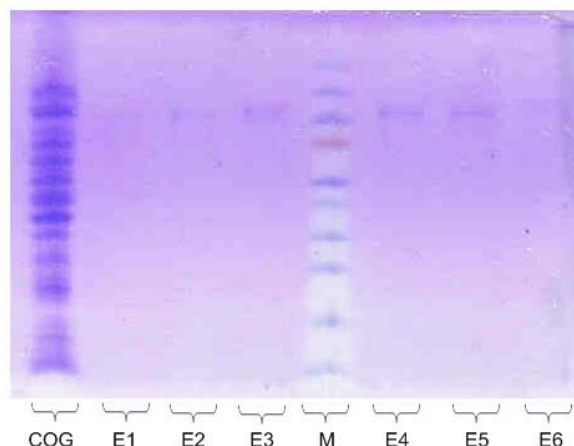
Slika 8: Prikaz delov elektroforeznega gela, ki smo jih izrezali za elektroelucijo.

Elektroelucijo smo izvedli s koščki gela, izrezanimi iz neobarvanega dela elektroforeznega gela. Na levi stezi so markerji za molekulske mase (Fermentas, SM 0671), na desni stezi proteini *M. corogypsi*. Zbrane eluate smo poimenovali po poziciji na gelu (E1–E6).

4.10.1 Preverjanje nevraminidazne aktivnosti po elektroeluciji

Test nevraminidazne aktivnosti smo izvedli tako, da smo 15 μ l eluatov dodali 2,5 μ l substrata BIN [1 mg/ml]. Rezultati so bili negativni v vseh eluatih. Predvidevali smo, da nevraminidazno aktivnost moti prisotnost SDS in pufer z visoko koncentracijo soli, zato smo preverili še nevraminidazno aktivnost eluatov na membrani po podaljšanem spiranju membrane v fosfatnem pufru. Test je pokazal šibko nevraminidazno aktivnost v eluatu E3.

4.10.2 Elektroforezni gel po elektroeluciji



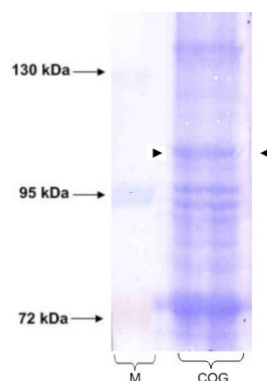
Slika 9: Elektroforezni gel po elektroeluciji s prečiščenimi proteini velikosti 95–130 kDa.

COG: kultura *M. corogypsi* **E1–E6:** eluati 1–6 (glej Sliko 8) **M:** marker (Fermentas, SM0671).

Po elektroeluciji smo proteine iz eluatov vezali na membrano in tako potrdili, da ima protein velikosti 105–110 kDa nevraminidazno aktivnost.

4.11 DOLOČITEV N-TERMINALNE AMINOKISLINSKE SEKVENCE PROTEINA VELIKOSTI 110 kDa

Za določitev N-terminalne aminokislinske sekvence smo ponovno izvedli SDS PAGE elektroforezo s suspenzijo celic *M. corogypsi*. Vse vzorce smo nanegli z nalagalnim pufrom brez β -merkaptotetanol. Nato smo proteine prenesli na membrano Immobilon P. Iz membrane smo izrezali liso, v kateri so bili proteini velikosti 110 kDa in jo poslali na Inštitut Jožef Stefan, kjer so določili N-terminalno aminokislinsko zaporedje.



Slika 10: Profil proteinov *M. corogypsi* na poliviniliden fluoridni membrani.
M – Proteinski markerji z označenimi molekulskimi masami (Fermentas; SM0671).
COG – Proteinski profil v suspenziji celic *M. corogypsi*. Trikotnika označujeta protein, ki smo mu določili aminokislinsko zaporedje.

Določeno zaporedje je: SLPDXNX. Zaporedje predstavlja N-terminalni del aminokislilin, ki sestavljajo protein *M. corogypsi*, velik 110 kDa. Za protein s tako molekulsko maso smo na več načinov dokazali nevraminidazno aktivnost. Pri aminokislinski poravnavi z orodjem BLAST, smo dobili ujemanja z več različnimi proteini. E-vrednosti ujemanj so pokazale, da gre pri vseh najdenih poravnava le za naključno ujemanje (e-vrednosti 203 in višje). Zaporedja ne moremo neposredno povezati z nevraminidazo.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Nevraminidazno aktivnost pri *M. corogypsi* smo primerjalno merili z dvema testoma z različnima substratoma. Za nadaljnja merjenja nevraminidazne aktivnosti smo se odločili za kromogeni substrat BIN. Uporaba substrata BIN je enostavna, molekula je obstojna pri sobni temperaturi, pozitivno reakcijo opazimo relativno hitro (približno v 10 do 30 minutah), negativna kontrola ostane negativna v času merjenja (včasih tudi več dni). Fluorogeni substrat MUAN se je izkazal za zelo neobstojnega pri sobni temperaturi, v nekaj minutah je začela fluorescirati tudi negativna kontrola (Slika 2), kar pomeni, da je z njim potrebno delati hitro, rezultati pa niso zanesljivi in njihovo odčitavanje je oteženo, posebno v primerih, ko nevraminidazna aktivnost ni močna. Veliko število substratov za merjenje nevraminidazne aktivnosti, ki so jih uporabljali v preteklosti, je bilo naravnega izvora (npr. ovomucin, fetuin, transferin, ganglioziidi možganov, sluz različnih vretenčarjev). Testi z njimi so bili dolgotrajni in zapleteni. Danes se za merjenje nevraminidazne aktivnosti uporabljajo predvsem sintetični substrati z znano kemijsko strukturo, s pomočjo katerih lahko merimo intenziteto barve ali fluorescence (Abrashev in Dulguerova, 2000).

Z razgradnjo substrata, specifičnega za nevraminidazo, smo posredno dokazali njeno prisotnost pri bakteriji *M. corogypsi*. Glede na mesto v celici poznamo več različnih tipov nevraminidaz. Mikroorganizmi lahko sproščajo nevraminidaze v medij, pri drugih je vezana na membrano, pri tretjih pa je v intracelularnem prostoru. Nekateri mikroorganizmi sintetizirajo več tipov nevraminidaz hkrati. (Roggentin in sod., 1993). Da bi ugotovili tip nevraminidaze, ki jo sintetizira *M. corogypsi*, smo preverili nevraminidazno aktivnost v suspenziji celic, supernatantu celične kulture in v njegovem filtratu ter v membranski in citoplazemski frakciji. Rezultati, ki smo jih

odčitani eno uro po dodatku substrata BIN, so bili pozitivni v suspenziji celic, v supernatantu celične kulture, v filtratu supernatanta kulture ter v membranski frakciji (Preglednici 5 in 6). Negativni rezultat smo odčitali v citoplazemski frakciji. Glede na rezultate o nevraminidazni aktivnosti lahko sklepamo, da *M. corogypsi* sintetizira membransko vezano nevraminidazo in da se topna oblika nevraminidaze sprošča v gojišče. Na podlagi teh rezultatov ne moremo z gotovostjo trditi, da gre pri vezani in sproščeni obliki nevraminidaze za enaka proteina. Nevraminidaza se v gojišče lahko sprosti z neaktivnim odcepom z membrane, lahko pa jo bakterija v gojišče izloča z aktivnim transportom. V tem primeru obstaja možnost, da gre za dva proteina z različnima molekulskima masama. Pri aktivnem transportu sodeluje več različnih transportnih proteinov in receptorjev, ki prepoznavajo različna signalna aminokislinska zaporedja in oblike transportiranega proteina. Transportirani protein ima tudi signalni del, ki določa njegovo končno mesto. Če gre za membransko vezan protein, mora le ta vsebovati hidrofobno sidro, da se lahko umesti v membrani ali pa mora imeti mesto, ki mu omogoča pripenjanje na druge strukture umeščene na/v membrano. Teh struktur proteini, ki so sproščeni v okolje, navadno nimajo in zato obstaja možnost, da *M. corogypsi* sintetizira dva proteina z različnima molekulskima masama, katera imata oba nevraminidazno aktivnost.

Nevraminidazno aktivnost smo merili v suspenziji celic, ki je bila 1000-kratno skoncentrirana glede na izhodno kulturo *M. corogypsi*. Časovni okvir, v katerem smo spremljali aktivnost, je bila ena ura. V tem času smo v suspenziji celic določili pozitivno reakcijo do redčitve 1 : 8 (Preglednica 5). V primerjalnem testu določanja nevraminidazne aktivnosti s kromogenim in fluorogenim substratom, smo pri substratu BIN dobili pozitivno reakcijo v 70-ih minutah tudi v redčitvi 1 : 64 (Preglednica 7). V supernatantu in v njegovem filtratu smo v eni uri dobili pozitiven rezultat v redčitvi 1 : 8 (Preglednica 6). Iz Preglednice 7 je razvidno, da je bil pozitiven rezultat redčitve suspenzije celične kulture *M. corogypsi* do 1 : 8, odčitani že v 10-ih minutah. Glede na vse omenjene rezultate lahko trdimo, da ima bakterija *M.*

corogypsi močno nevraminidazno aktivnost. Močno nevraminidazno aktivnost *M. corogypsi* so potrdili tudi drugi avtorji. *M. corogypsi* je uvrščena v filogenetsko gručo *M. synoviae*. Nevraminidazno aktivnost so potrdili tudi pri nekaterih drugih vrstah te gručice. Med mikoplazmami, ki jih najdemo pri pticah, so veliko aktivnost potrdili pri različnih sevih *M. synoviae*, zelo veliko pa pri *M. corogypsi*, druge testirane vrste so kazale šibkejšo aktivnost (Brown in sod., 2004; Berčič in sod., 2008).

Nevraminidazi *M. corogypsi* smo določili več lastnosti.

Določili smo temperaturo, pri kateri nevraminidaza izgubi svojo aktivnost. Temperaturni optimum je za večino nevraminidaz med 35 °C in 40 °C (Abrashv in Dulguerova, 2000), zato smo inkubacijo pri povišani temperaturi začeli pri 45 °C, izvajali smo jo eno uro (Preglednica 8). Pri tej temperaturi se je aktivnost ohranila, a je bila manjša, pozitivno reakcijo smo dobili po 40-ih minutah, kar pomeni dvakrat daljši čas glede na kontrolni vzorec, inkubiran na sobni temperaturi. Precej manjšo aktivnost smo opazili po inkubaciji na 50 °C, saj je bil rezultat pozitiven šele po 24-ih urah. Po inkubaciji na 55 °C aktivnosti ni bilo več. Podobno občutljivost na povišano temperaturo ima tudi nevraminidaza iz *M. canis*, ki pri 50 °C delno izgubi aktivnost, pri 55 °C pa aktivnosti ni več (Zakrajšek, 2008). Zanimivo je, da nevraminidaza iz *M. gallisepticum* izgubi aktivnost pri precej višji temperaturi (70 °C) (Sethi in Müller, 1972).

Optimalni pH za delovanje bakterijskih nevraminidaz je med 5,0 in 7,0 (Abrashv in Dulguerova, 2000). Pričakovali smo, da bo tudi optimum nevraminidaze iz *M. corogypsi* v rahlo kislem do nevtralnem območju. Vendar pa rezultati niso potrdili pričakovanj, saj smo največjo aktivnost izmerili v bazičnem območju pri vrednostih pH od 8 do 10 (Preglednica 9). To se ujema s pH optimumom delovanja nevraminidaze iz *M. canis* (pH 9) (Zakrajšek, 2008) in se precej razlikuje od optimalnega pH za nevraminidazo iz *M. gallisepticum* (pH 5,8) (Sethi in Müller, 1972).

Nevraminidaze nekaterih bakterij za svoje delovanje nujno potrebujejo kalcijeve ione (Abrashev in Dulguerova, 2000). Predhodno opravljene teste aktivnosti smo izvedli brez prisotnih kalcijevih ionov v raztopini ter dobili pozitivne rezultate. Posledično smo sklepali, da nevraminidaza iz *M. corogypsi* za svoje delovanje kalcijevih ionov sicer ne potrebuje, lahko pa le ti izboljšajo njeno delovanje. Dodatek kalcijevih ionov v raztopino je nevraminidazno aktivnost izboljšal pri vrednosti pH 3, pri višjih pH vrednostih pa dodani ioni niso vplivali na izboljšanje nevraminidazne aktivnosti (Preglednica 10). S tem smo ugotovili, da nevraminidaza iz *M. corogypsi* spada v skupino nevraminidaz, ki za svoje delovanje ne potrebujejo Ca^{2+} . Prisotnost kalcijevih ionov aktivnosti ne izboljša bistveno.

Nevraminidaza *M. canis* za svoje delovanje prav tako ne potrebuje kalcijevih ionov, njihova prisotnost pa aktivnost prav tako rahlo izboljša (Zakrajšek, 2008). V nasprotju pa nevraminidaza iz *M. gallisepticum* bistveno bolje deluje ob prisotnosti kalcijevih ionov (Sethi in Müller, 1972).

Molekulska masa nevraminidaze *M. corogypsi* v celični suspenziji (vezana na celice) in v supernatantu kulture (sproščena v gojišče) smo želeli določiti z ločitvijo proteinov z SDS poliakrilamidno elektroforezo ter s prenosom na poliviniliden fluoridno membrano Immobilone P. Pri tem smo imeli nekaj težav, saj na membrano prenesen encim ni kazal nevraminidazne aktivnosti. V testu smo uporabili vzorec številka 120, ki smo ga pridobili po gelski kromatografiji in je kazal najvišjo aktivnost. Preverili smo, kako vpliva na aktivnost encima vezava na blokirano oz. neblokirano membrano (Sliki 3 in 4). Rezultati so pokazali, da so bile reakcije na s Tween 20 PBS blokirani membrani nekoliko šibkejše in počasnejše (Sliki 3 in 4, Preglednica 12), vendar pa vezava ni preprečila aktivnosti encima. Počasnejše reakcije so verjetno posledica delovanja neionskega detergenta Tween 20 na encim. Pri prenosu z elektroforeznega gela na membrano smo aktivnost preverjali na neblokirani membrani, zato predvidevamo, da se je encim denaturiral med samo elektroforezo zaradi prisotnosti

SDS in/ali zaradi visokih temperatur med elektroforezo in med prenosom na membrano. Berčič in sodelavci poročajo, da je nevraminidaza iz *M. corogypsi* pri prenosu z gela na membrano v nekoliko drugačnem sistemu ohranila aktivnost in je bila molekulska masa proteina, ki je reagiral s substratom BIN približno 110 kDa (Berčič in sod., 2008).

Ker po prenosu na membrano nismo uspeli potrditi nevraminidazne aktivnosti, smo želeli protein z nevraminidazno aktivnostjo izolirati. Če bi imel vzorec nevraminidazno aktivnost in bi z elektroforezo potrdili, da je v vzorcu prisoten le en protein, bi lahko z gotovostjo trdili, da imamo po elektroforezi in prenosu na poliviniliden fluoridno membrano, na membrani vezano nevraminidazo, čeprav aktivnosti na membrani ne bi zaznali.

Nevraminidazo, ki se izloča v medij, smo želeli skoncentrirati in izolirati od drugih proteinov, ki so bili prisotni v izrabljenem gojišču. Modificiran rastni medij po Frey-u je vseboval 10% prašičji serum (Berčič in sod., 2008), težave so nam povzročala predvsem protitelesa IgG, ki so prisotna v serumu. Del proteinov smo želeli odstraniti z frakcioniranim obarjanjem z nasičenim amonijevim sulfatom, preostale pa z nadaljnjim čiščenjem vzorca z gelsko kromatografijo. Po obarjanju z amonijevim sulfatom smo ugotovili, da se majhen del nevraminidaze obori pri 30% koncentraciji amonijevega sulfata, vsa pa se iz raztopine izloči pri 50% koncentraciji (Preglednica 11). Vzorec smo nato ločili še z gelsko kromatografijo ter v nekaterih zbranih frakcijah potrdili prisotnost nevraminidaze.

Vzorec (frakcijo 120) smo ločili z SDS poliakrilamidno elektroforezo. Ugotovili smo, da vzorci ne vsebujejo le enega proteina, kar je pomenilo, da v vzorcu še vedno nimamo prečiščenega encima nevraminidaze (Slika 7, steza B2). Zato smo preverili, če so v vzorcu prisotna prašičja IgG protitelesa, kar se je tudi potrdilo (Sliki 5 in 6). Iz vzorca smo poskusili odstraniti protitelesa s pomočjo gela Concanavalin A in Proteina G. Z

obema postopkoma nam je uspelo IgG protitelesa le delno odstraniti iz vzorca (Sliki 5 in 6). Na elektroforeznem gelu smo po delni odstranitvi IgG protiteles opazili manjše število proteinov, še vedno pa je bil prisoten protein s približno molekulsko maso 110 kDa (Slika 7, steza B1). Sklepamo, da je protein velik 110 kDa nevraminidaza *M. corogypsi*, ki jo mikoplazma sprošča v gojišče.

Nevraminidazo iz celičnega lizata *M. corogypsi* smo skušali izolirati od ostalih proteinov s pomočjo elektroelucije (Slika 8). Z elektroelucijo smo proteine velike od 95 kDa do 130 kDa iz gela ponovno izločili v topni obliki. V eluatih nam ni uspelo dokazati nevraminidazne aktivnosti, predvidevali smo, da aktivnost motita prisotnost SDS in pufer z visoko koncentracijo soli. Zato smo proteine iz eluatov vezali še na P PVDF membrano in da bi odstranili vse moteče dejavnike, podaljšali spiranje v fosfatnem pufru. Test je pokazal šibko nevraminidazno aktivnost v eluatu E3. Eluat smo nato ponovno nanesti na elektroforezni gel in slika je pokazala, da je v pozitivnem eluatu samo en protein (Slika 9). Elektroelucija se je za čiščenje proteinov izkazala primernejša od obarjanja in gelske kromatografije. Z elektroelucijo očistimo protein hitreje in bolj zanesljivo kakor z gelom Concanavalin A ali proteinom G. Glede na rezultate smo zaključili, da ima nevraminidaza iz *M. corogypsi* molekulsko maso približno 105–110 kDa. To ustreza že objavljenim podatkom (Berčič in sod., 2008).

Dobljeno N-terminalno aminokislinsko zaporedje SLPDXNX pripada proteinu *M. corogypsi* z molekulsko maso 105–110 kDa (Slika 10). Dokazali smo, da ima tudi nevraminidaza *M. corogypsi* takšno molekulsko maso. Aminokislinska poravnava z orodjem BLAST je pokazala, da zaporedja ne moremo povezati z nobenim proteinom z znanim aminokislinskim zaporedjem.

5.3 SKLEPI

- *M. corogypsi* sintetizira nevraminidazo vezano na membrano celice in sproščeno obliko nevraminidaze. Obe obliki imata molekulsko maso približno 110 kDa.
- Nevraminidaza *M. corogypsi* ima optimalni pH delovanja v bazičnem območju med pH vrednostmi 8–10.
- Nevraminidaza za svoje delovanje ne potrebuje kalcijevih ionov, njihova prisotnost poveča aktivnost le pri nizkih pH vrednostih.
- Nevraminidazna aktivnost se izgubi po enourni inkubaciji na 55°C.
- N-terminalno aminokislinsko zaporedje SLPDXNX pripada proteinu z molekulsko maso 110 kDa.

6 POVZETEK

Mikoplazme so bakterije z najmanjšim znanim genomom, ki so še sposobne samostojnega podvojevanja. Imajo poenostavljene metabolne poti, zato za rast potrebujejo kompleksna gojišča, njihova posebnost je tudi odsotnost celične stene. V naravi so razširjene kot paraziti ljudi in živali, najdemo jih predvsem na sluznicah, okužbe, ki jih povzročajo pa so navadno blage, a kronične. Ne proizvajajo endotoksinov in klasičnih eksotoksinov. Pomemben element v patogenezi mikoplazem je pritrjanje na celice gostitelja. Veliko organizmov, ki živijo v stiku z višjimi organizmi, sintetizira nevraminidazo. Nevraminidaza je encim, ki z glikokonjugatov odceplja sialično kislino. Sialična kislina je pogost končni sladkor na glikokonjugatih evkariontov. Nevraminidaza pa je zaradi svojih lastnosti pomemben virulenčni dejavnik.

Mikoplazmo *Mycoplasma corogypsi* so izolirali z ognjoka na podplatu črnega jastreba. Uvrščamo jo med mikoplazme, ki okužujejo ptice, vendar je danes o tej vrsti znanega malo. Eden redkih podatkov o tej bakteriji je, da ima močno nevraminidazno aktivnost.

Namen dela je bil potrditi nevraminidazno aktivnost pri *M. corogypsi*. Zaradi pozitivne aktivnosti smo sklepali, da bakterija sintetizira encim nevraminidazo. Za določanje aktivnosti in tipa nevraminidaze smo uporabili preprost test s kromogenim substratom. Rezultati so pokazali, da bakterija sintetizira na membrano vezano in v gojišče sproščeno nevraminidazo. Določili smo, da pri temperaturi 55 °C nevramnidaza *M. corogypsi* izgubi aktivnost, optimalni pH delovanja ima v bazičnem območju, vpliv kalcijevih ionov na nevraminidazno aktivnost pa je zanemarljiv. V želji po čim čistejšem proteinu z nevraminidazno aktivnostjo smo z različnimi metodami iz supernatanta celične kulture *M. corogypsi* odstranili večino preostalih proteinov. Za identifikacijo nevraminidaze v proteinskem profilu smo ločili proteine *M. corogypsi* z

SDS poliakrilamidno elektroforezo in jih prenesli na membrano ter jo prelili s kromogenim substratom, da smo lahko določili molekularno maso proteina. Določili smo N-terminalno aminokislinsko zaporedje proteina velikega približno 110 kDa.

7 VIRI

Abrashev I., Dulguerova G. 2000. Neuraminidase (sialidases) from bacterial origin. *Experimental Pathology and Parasitology*, 4: 35–40

Aisaka K., Igarashi A., Uwajima T. 1991. Purification, crystallization, and characterization of neuraminidase from *Micromonospora viridifaciens*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 4: 997–1004

Almagor M., Kahane I., Gilon C., Yatziv S. 1986. Protective effects of the glutathione redox cycle and vitamin E on cultured fibroblasts infected by *Mycoplasma pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 52, 1: 240–244

Angata T., Varki A. 2002. Chemical diversity in the sialic acids and related α -keto acids: an evolutionary perspective. *Chemical Reviews*, 102, 2: 439–469

Benčina D., 2002. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Pathology*, 31: 535–547

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: 463–472

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

Bove J. M. 1993. Molecular features of mollicutes. *Clinical Infectious Diseases*, 17: S10–S31

Bradbury J.M. 2001. Avian mycoplasmas. V: *Poultry diseases*. Jordan F., Pattison M., Alexander D., Faragher T. (eds.). London, W.B. Saunders: 178–193.

Brown D. R., Zacher L. A., Farmerie W. G. 2004. Spreading factors of *Mycoplasma alligatoris*, a flesh-eating mycoplasma. *Journal of Bacteriology*, 186, 12: 3922–3927

Cahill J. F., Cole B. C., Wiley B. B., Ward J. R. 1971. Role of biological mimicry in the pathogenesis of rat arthritis induced by *Mycoplasma arthritidis*. *Infection and Immunity*, 3, 1: 24–35

Dallo S. F., Chavoya A., Baseman J. B. 1990. Characterization of the gene for a 30-kDa adhesin-related protein of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 58: 4163–4165

Dirksen L. B., Proft T., Hilbert H., Plagens H., Herrmann R., Krause D. C. 1996. Nucleotide sequence analysis and characterization of the *hmw* gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae*. *Gene*, 171, 1: 19–25

Ernst S., Langer R., Cooney C. L., Sasisekharan R. 1995. Enzymatic degradation of glycosaminoglycans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 5: 387–444

Ezepchik Y., Vertiev Y., Kostoyukova N. 1973. Neuraminidase of *Corynebacterium diphtheriae* as a factor of pathogenicity with spreading function. *Biull. Eksperiment. Biol. Med.*, 75: 63–65. Cit. po: Abrashev I., Dulguerova G. 2000. Neuraminidase (sialidases) from bacterial origin. *Experimental Pathology and Parasitology*, 4: 35–40

Fraser C.M., Gocayne J.D., White O., Adams M.D., Clayton R.A., Fleischmann R.D., Bult C.J., Kerlavage A.R., Sutton G., Kelley J.M. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270, 5235: 397–403

Gabriel O., Heeb M., Hinrich M. 1984. Interaction on the surface adhesin of the oral *Actinomyces* spp. with mammalian cells. Molecular basis of oral microbial adhesion. Proceedings of an ASM workshop in Philadelphia, 45–52: 1568–1572. Cit. po: Abrashev I., Dulguerova G. 2000. Neuraminidase (sialidases) from bacterial origin. *Experimental Pathology and Parasitology*, 4: 35–40

Garrity G. M., Liburn T. G., Cole J. R., Harrison S. H., Euzéby J., Tindall B. J. 2007. The Bacteria: Phylum "*Firmicutes*": Class: *Mollicutes*. *Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea*, 7.7: 317–332

Gesner R., Thomas L. 1966. Sialic binding sites: Role in hemagglutination by *Mycoplasma gallisepticum*. *Science*, 151: 590–596. Cit. po: Abrashev I., Dulguerova G. 2000. Neuraminidase (sialidases) from bacterial origin. *Experimental Pathology and Parasitology*, 4: 35–40

Grau O., Laigret F., Carle P., Tully J.G., Rose D. L., Bove J.M. 1991. Identification of a plant-derived mollicute as a strain of an avian pathogen, *Mycoplasma iowae*, and its implications for mollicute taxonomy. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 4: 473–478

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

Inamine J. M., Denny T. P., Loechel S., Schaper U., Huang C. H., Bott K. F., Hu P. C. 1988. Nucleotide sequence of the P1 attachment-protein gene of *Mycoplasma pneumoniae*. *Gene*, 64, 2: 217–229

Johansson K. E., Pettersson B. 2002. Taxonomy of Mollicutes. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Rasin S., Hermann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 31–44

Kahane I., Reisch-Saada A., Almagor M., Abeliuck P., Yatziv S. 1990. Glycosidase activities of mycoplasmas. *Zentralblatt für Bakteriologie = International Journal of Medical Microbiology*, 273, 3: 300–305

Kemp B. 1986. Effect of the removal of the cell surface sialic acids on cell aggregation in vitro. *Nature*, 218: 1255–1265. Cit. po: Abrashev I., Dulguerova G. 2000. Neuraminidase (sialidases) from bacterial origin. *Experimental Pathology and Parasitology*, 4: 35–40

Krause D. C. 1996. *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: unravelling the tie that binds. *Molecular Microbiology*, 20, 2: 247–253

Krause D. C., Leith D. K., Wilson R. M., Baseman J. B. 1982. Identification of *Mycoplasma pneumoniae* protein associated with hemadsorption and virulence. *Infection and Immunity*, 35: 809–817

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. Upper Saddle River, Pearson Education: 351–444

Maniloff J. 2002. Phylogeny and evolution. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Rasin S., Hermann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 31–44

May M., Brown D. R. 2008. Genetic variation in sialidase and linkage to N-acetylneuraminate catabolism in *Mycoplasma synoviae*. Microbial Pathogenesis, 45: 38–44

McGarrity G. J., Kotani H., Butler G. H. 1992. Mycoplasmas and tissue culture cell. V: Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis. Maniloff J., McElhaney R. N., Finch L. R., Baseman J. B. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology: 445–454

Miyata M., Seto S. 1999. Cell reproduction cycle of mycoplasma. Biochimie, 81, 8–9: 873–878

Miyata M., Uenoyama A. 2002. Movement on the cell surface of the gliding bacterium, *Mycoplasma mobile* is limited to its head-like structure. FEMS Letters, 215, 2: 285–289

Osawa S., Jukes T. H., Watanabe K., Muto A. 1992. Recent evidence for evolution of the genetic code. Microbiological Reviews, 56, 1: 229–264

Paddenberg R., Weber A., Wulf S., Mannherz H. G. 1998. Mycoplasma nucleases able to induce internucleosomal DNA degradation in cultured cells possess many characteristics of eukaryotic apoptotic nucleases. Cell Death and Differentiation, 5: 517–528

Paddenberg R., Wulf S., Weber A., Heimann P., Beck L. A., Mannherz H. G. 1996. Internucleosomal DNA fragmentation in cultured cells under conditions reported to induce apoptosis may be caused by mycoplasma endonucleases. *European Journal of Cell Biology*, 71, 1: 105–119

Panangala V. S., Stringfellow J.S., Dybvig K., Woodard A., Sun F., Rose D. L., Gresham M. M. 1993. *Mycoplasma corogypsi* sp. nov., a New Species from the Footpad Abscess of Black Vulture, *Coragyps atratus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43, 3: 585–590

Papazisi L., Gorton T. S., Kutish G., Markham P. F., Browning G. F., Nguyen D. K., Swartzell S., Madan A., Maharais G., Geary S. J. 2003. The complete genome: sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain R low. *Microbiology*, 149: 2307–2316

Pollack J. D., Williams M. V., Mcelhaney R. N. 1997. The comparative metabolism of the Mollicutes (mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function. *Critical Reviews in Microbiology*, 23, 4: 269–354

Ponnuraj K., Jedrzejak M. J. 2000. Mechanism of hyaluronan binding and degradation: structure of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase in complex with hyaluronic acid disaccharide at 1.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 299, 4: 885–895

Potier M., Mameli L., Belisle M., Dallaire L., Melancon S. B. 1979. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminate) substrate. *Analytical Biochemistry*, 94, 2: 287–296

- Razin S. 1978. The mycoplasmas. *Microbiological Reviews*, 42, 2: 414–470
- Razin, S., Oliver O. 1961. Morphogenesis of mycoplasma and bacterial L-form colonies. *Journal of General Microbiology*, 24: 225–237
- Razin S, Yogev D., Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 4: 1094–1156
- Roberts D. D., Olson L. D., Barile M. F., Ginsburg V., Krivan H. C. 1989. Sialic acid-dependent adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to purified glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 9289–9293
- Rodwell A. W., Whitcomb R. F. 1983. Cell lysis and isolation of membranes. V: *Methods in mycoplasmology*. 1st ed. Razin S., Tully J. G. (eds.). New York, Academic Press: 225–233
- Roggentin P., Rothe B., Lottspeich F., Schauer R. 1988. Cloning and sequencing of a *Clostridium perfringens* sialidase gene. *FEBS Letters*, 238, 1: 31–34
- 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
- Rottem S. 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiological Reviews*, 83: 417–432
- Rottem S., Barile M. F. 1993. Beware of mycoplasmas. *Trends in Biotechnology*, 11, 4: 143–151

Sasaki Y. 2006. Mycoplasma. V: Bacterial genomes and infectious diseases. Chan V. L., Sherman P. M., Bourke B. (eds.). New Jersey, Humana Press: 175–190

Schauer R. 2000. Achievements and challenges of sialic acid research. Glycoconjugate Journal, 17: 485–4999

Severi E., Hood D. W., Thomas G. H. 2007. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. Microbiology, 153: 2817–2822

Severi E., Randle G., Kivlin P., Whitfield K., Young R., Moxon R., Kelly D., Hood D., Thomas G. H. 2005. Sialic acid transport in *Haemophilus influenzae* is essential for lipopolysaccharide sialylation and serum resistance and is dependent on a novel tripartite ATP-independent periplasmic transporter. Molecular Microbiology, 58, 4: 1173–1185

Sethi K. K., Müller H. E. 1972. Neuraminidase activity in *Mycoplasma gallisepticum*. Infection and Immunity, 5, 2: 260–262

Shell D. M., Chiles L., Judd R. C., Seal S., Rest R. F. 2002. The *Neisseria* lipooligosaccharide-specific alpha-2,3-sialyltransferase is a surface-exposed outer membrane protein. Infection and Immunity, 70, 7: 3744–3751

Shibata K. I., Sasaki T., Watanabe T. 1995. AIDS-associated mycoplasmas possess phospholipases C in the membrane. Infection and Immunity, 63, 10: 4174–4177

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

Trachtenberg S. 1998. Mollicutes—wall-less bacteria with internal cytoskeletons. *Journal of Structural Biology*, 124, 2-3: 244–256

Traving C., Schauer R. 1998. Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54: 1330–1349

Uchida Y., Tsukada Y., Sugimori T. 1979. Enzymatic properties of neuraminidases from *Arthrobacter ureafaciens*. *Journal of Biochemistry*, 86, 5: 1573–1585

Vasconcelos A. T. R., Ferreira H. B., Bizarro C. V., Bonatto S. L., Carvalho M. O., Pinto P. M., Almeida D. F., Almeida L. G. P., Almeida R., Alves L., Assuncao E. N., Azevedo V. A. C., Bogó M. R., Brigido M. M., Brocchi M., Burity H. A., Camargo A. A., Camargo S. S., Carepo M. S., Carraro D. M., Cascardo J. C. D., Castro L. A., Cavalcanti G., Chemale G., Collevatti R. G., Cunha C. W., Dallagiovanna B., Dambros B. P., Dellagostin O. A., Falcao C., Fantinatti-Garboggini F., Felipe M. S. S., Fiorentin L., Franco G. R., Freitas N. S. A., Frias D., Grangeiro T. B., Grisard E. C., Guimares C. T., Hungria M., Jardim S. N., Krieger M. A., Laurino J. P., Lima L. F. A., Lopes M. I., Loreto E. L. S., Madeira H. M. F., Manfio G. P., Maranhao A. Q., Martinkovics C. T., Medeiros S. R. B., Moreira M. A. M., Neiva M., Ramalho-Neto C. E., Nicolas M. F., Oliveira S. C., Paixao R. F. C., Pedrosa F. O., Pena S. D. J., Pereira M., Pereira-Ferrari L., Piffer I., Pinto L. S., Potrich D. P., Salim A. C. M., Santos F. R., Schmitt R., Schneider M. P. C., Schrank A., Schrank I. S., Schuck A. F., Seuanez H. N., Silva D. W., Silva R., Silva S. C., Soares C. M. A., Souza K. R. L., Souza R. C., Staats C. C., Steffens M. B. R., Teixeira S. M. R., Urményi T. P., Vainstein M. H., Zuccherato L. W., Simpson A. J. G., Zaha A. 2005. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology*, 187: 5568–5577

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

Vimr E., Lichtensteiger C., Steenbergen S. 2000. Sialic acid metabolism's dual function in *Haemophilus influenzae*. *Molecular Microbiology*, 36, 5: 1113–1123

Weiss I., Mayew E., Ulrich K. 1969. Effect of neuraminidase of the phagocytic process in human monocytes. *Laboratory Investigation*, 15: 1304–1306. Cit. po: Abrashev I., Dulguerova G. 2000. Neuraminidase (sialidases) from bacterial origin. *Experimental Pathology and Parasitology*, 4: 35–40

Zakrajšek T. 2008. Nevraminidazna aktivnost bakterije *Mycoplasma canis*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta. Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 75 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. Mojci Narat, za vodenje, pomoč in nasvete pri laboratorijskem delu in pri pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi znanstvenemu sodelavcu in somentorju, dr. Dušanu Benčini, za vodenje pri laboratorijskem delu, za nasvete pri pisanju diplomske naloge, za hiter ter temeljit pregled dela in za konstruktivne pripombe.

Zahvaljujem se tudi vsem tistim na Oddelku za zootehniko, ki so mi med izdelavo diplomske naloge, kakorkoli priskočili na pomoč z nasveti in praktičnim znanjem.

Zahvaljujem se tudi svojim staršem, ki so mi skozi celoten študij stali ob strani in verjeli vame.