

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Barbara PISTIVŠEK

**IDENTIFIKACIJA RECEPTORJA ZA Fc DEL IgY  
MOLEKULE BAKTERIJE *Mycoplasma synoviae***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Barbara PISTIVŠEK

**IDENTIFIKACIJA RECEPTORJA ZA Fc DEL IgY MOLEKULE  
BAKTERIJE *Mycoplasma synoviae***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**IDENTIFICATION OF THE RECEPTOR FOR Fc PART OF IgY  
MOLECULE OF BACTERIUM *Mycoplasma synoviae***

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

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

Podpisana Pistivšek Barbara 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 dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Mojca Narat in za recenzenta znanstvenega svetnika dr. Dušana Benčina.

Mentorica: prof. dr. Mojca Narat

Recenzent: znanstveni svetnik dr. Dušan Benčina

Komisija za oceno in zagovor diplomskega dela:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor Nekrep  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: 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

Datum zagovora: 27. 11. 2007

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Barbara PISTIVŠEK

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 577.27:636.5.09:616.9(043)=863
- KG imunologija/immunoglobulini razreda Y/IgY/*Mycoplasma synoviae*/bolezni perutnine/kužni sinovitis/receptor za Fc del imunoglobulinov/receptor FcR
- AV PISTIVŠEK, Barbara
- SA NARAT, Mojca (mentorica)/BENČINA, Dušan (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2007
- IN IDENTIFIKACIJA RECEPTORJA ZA Fc DEL IgY MOLEKULE BAKTERIJE *Mycoplasma synoviae*
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 49 str., 7 pregl., 11 sl., 60 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Številne bakterije imajo na svoji površini receptorje za Fc del imunoglobulinov (FcR), ki lahko vežejo različne razrede in podrazrede imunoglobulinov (Ig) različnih živalskih vrst. Pri bakteriji *Mycoplasma synoviae*, ki povzroča pri kokoših in puranih patološke procese, so odkrili FcR, ki vežejo kokošje Ig razreda Y (IgY). Pri različnih izolatih *M. synoviae* se molekulske mase FcR razlikujejo. Mi smo poskušali dokazati FcR pri izolatu ULB01B/P4, ki je bil izoliran iz dihal kokoši v Sloveniji. Za identifikacijo FcR *M. synoviae* smo izvedli encimskoimunski test. Najprej smo bakterijske celice lizirali in vzorec shranili za kasnejše elektroforeze, s katerimi smo bakterijske proteine ločili med seboj. Po prenosu proteinov iz gela na membrano smo izvedli encimskoimunske teste s kokošjim serumom ali Fc fragmentom kokošjih IgY. Izolacija Fc fragmenta z imunoafinitetno CNBr ali HPLC kromatografijo po razgradnji IgY s papainom ni uspela, zato smo uporabili komercialni Fc fragment. Pri inkubaciji membrane s kokošjim serumom, smo dobili reakcijo z dvema proteinoma z molekulskima masama približno 85 kDa in 90 kDa, za katera smo sklepali, da sta FcR. Ponovili smo elektroforezo in v encimskoimunskem testu uporabili Fc fragment kokošjih IgY. Prišlo je do reakcije s proteinom(a) z molekulsko maso približno 82-85 kDa, ki verjetno predstavlja(ta) FcR seva ULB01B/P4.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 577.27:636.5.09:616.9(043)=863
- CX immunology/immunoglobulins of the Y class/IgY/*Mycoplasma synoviae*/poultry diseases/infectious synovitis/receptor for the Fc part of immunoglobulins/FcR receptor
- AU PISTIVŠEK, Barbara
- AA NARAT, Mojca (supervisor)/BENČINA, Dušan (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2007
- TI IDENTIFICATION OF THE RECEPTOR FOR Fc PART OF IgY MOLECULE OF BACTERIUM *Mycoplasma synoviae*
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO IX, 49 p., 7 tab., 11 fig., 60 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Numerous bacteria have receptors for the Fc part of the immunoglobulin molecules (FcR) on their surface, which can bind immunoglobulins (Ig) of various classes, subclasses and of different origin. The bacterium *Mycoplasma synoviae*, which is a chicken and turkey pathogen, has a FcR that can bind the chicken Ig of the Y class (IgY). The molecular weight of the FcR can vary among different *M. synoviae* isolates. We tried to identify the FcR of the ULB01B/P4 isolate, which was isolated from the choanal cleft of chicken from Slovenia. An immunoassay was made for the identification of FcR. We lysed bacterial cells and saved the sample until we used it for electrophoresis, with which we separated bacterial proteins. After the transfer of separated proteins from the gel to the membrane, the immunoassay using a chicken serum or a Fc fragment of chicken IgY was done. We were unable to produce the Fc fragment from chicken IgY with papain digestion, which is why we used commercial Fc fragment. The incubation of membrane in chicken serum resulted in a detection of two proteins with molecular masses of approximately 85 kDa and 90 kDa, for which we assumed that they were FcR. We repeated the electrophoresis and used the Fc fragment of IgY in the immunoassay. There was a reaction with protein(s) of approximately 82-85 kDa, which probably represent(s) the FcR of the ULB01B/P4 isolate.

## KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
	KAZALO VSEBINE .....	V
	KAZALO PREGLEDNIC .....	VII
	KAZALO SLIK .....	VIII
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	IX
<b>1</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1	NAMEN DELA .....	2
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV.....</b>	<b>3</b>
2.1	MIKOPLAZME.....	3
<b>2.1.1</b>	<b>Okužba z bakterijo <i>Mycoplasma synoviae</i> .....</b>	<b>4</b>
2.1.1.1	Patogeni dejavniki <i>M. synoviae</i> .....	6
2.2	IMUNSKI SISTEM .....	7
<b>2.2.1</b>	<b>IgG in IgY .....</b>	<b>7</b>
2.2.1.1	Podenote imunoglobulinov .....	8
<b>2.2.2</b>	<b>Uporaba IgY .....</b>	<b>9</b>
2.3	HUMORALNI IMUNSKI ODZIV NA <i>M. synoviae</i> .....	11
<b>2.3.1</b>	<b>Antigenska spremenljivost.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Navzkrižna reaktivnost .....</b>	<b>14</b>
2.4	BAKTERIJSKI RECEPTORJI ZA Fc DEL IMUNOGLOBULINOV.....	15
<b>2.4.1</b>	<b>FcR pri <i>M. synoviae</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>19</b>
3.1	PRIPRAVA PROTEINOV <i>M. synoviae</i> ZA IDENTIFIKACIJO FcR.....	19
<b>3.1.1</b>	<b><i>Mycoplasma synoviae</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.2</b>	<b>NaDS elektroforeza v poliakrilamidnem gelu .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Prenos proteinov iz gela na membrano.....</b>	<b>20</b>
3.2	PRIPRAVA DETEKCIJSKEGA REAGENTA ZA FcR .....	21
<b>3.2.1</b>	<b>Razgradnja kokošjih IgY s papainom .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Izolacija Fc fragmentov .....</b>	<b>23</b>
3.2.2.1	Imunoafinitetna CNBr kromatografija.....	23
3.2.2.2	HPLC kromatografija .....	25

3.3	USPEŠNOST PRIPRAVE Fc FRAGMENTOV KOKOŠJIH IgY .....	25
3.3.1	<b>DIBA po imunoafinitetni CNBr kromatografiji .....</b>	<b>26</b>
3.3.2	<b>DIBA po HPLC kromatografiji.....</b>	<b>27</b>
3.4	IDENTIFIKACIJA RECEPTORJA ZA Fc DEL IgY (FcR).....	28
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>29</b>
4.1	USPEŠNOST PRIPRAVE Fc FRAGMENTOV KOKOŠJIH IgY .....	29
4.1.1	<b>Testiranje frakcij na prisotnost protiteles po CNBr kromatografiji .....</b>	<b>29</b>
4.1.2	<b>Izolacija Fc fragmentov s HPLC kromatografijo .....</b>	<b>30</b>
4.1.2.1	Testiranje frakcij na prisotnost protiteles po HPLC kromatografiji .....	31
4.2	IDENTIFIKACIJA Fc RECEPTORJA V PROTEINSKEM PROFILU <i>M. synoviae</i> .....	33
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>36</b>
5.1	RAZPRAVA .....	36
5.2	SKLEPI .....	41
<b>6</b>	<b>POVZETEK .....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>44</b>

**ZAHVALA**

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Nekaj lastnosti IgY, ki jim dajejo prednost pri uporabi pred IgG (Narat, 2003).....	11
Preglednica 2: Nespecifična vezava bakterijskih proteinov A in G ter receptorjev za Fc del Ig <i>M. synoviae</i> z imunoglobulini različnih živalskih izvorov, razredov in podrazredov (Lauerma in Reynolds-Vaughn, 1991; Haugland, 2005) .....	16
Preglednica 3: Molekulske mase Fc receptorjev pri šestih vrstah ptičjih mikoplazem, kot so jih določili v raziskavi na podlagi različnega števila izolatov (Lauerma in sod., 1993).....	17
Preglednica 4: Primarna mišja monoklonska protitelesa proti kokošjim IgY, ki smo jih uporabili pri testu DIBA .....	26
Preglednica 5: Shema encimskoimunskih testov za identifikacijo FcR pri <i>M. synoviae</i> ULB01B/P4. ....	28
Preglednica 6: Zasnova testa DIBA s pričakovanimi rezultati .....	29
Preglednica 7: Rezultat testa DIBA za frakciji 3 in 4 po HPLC kromatografiji s papainom razgrajenih kokošjih IgY.....	32



## KAZALO SLIK

Slika 1: Sklepi na nogah, ki jih infekcijski sinovitis najpogosteje prizadene.....	5
Slika 2: Primerjava zgradb IgG in IgY (Chiou, 2002).....	8
Slika 3: Primer lažno pozitivnega rezultata pri aglutinaciji lateksa (Dávalos-Pantoja in sod., 2000, str. 658) .....	10
Slika 4: Sestava bakterijskega lipoproteina (Chambaud in sod., 1999, str. 495).....	12
Slika 5: Shema posrednega (A) in neposrednega (B) encimskoimunskega testa .....	25
Slika 6: Shema posrednega encimskoimunskega testa (DIBA) za preverjanje prisotnosti težkih in lahkih verig v frakcijah 13 in 17 po imunoafinitetni CNBr kromatografiji.....	27
Slika 7: Neposredni encimskoimunski test za kontrolo specifične vezave konjugata .....	27
Slika 8: Rezultati testa DIBA za frakciji 13 in 17, pridobljenih s CNBr kromatografijo .....	30
Slika 9: Elucijski profil po HPLC kromatografiji.....	31
Slika 10: Profil proteinov <i>M. synoviae</i> (ULB01B/P4) na membrani po elektroforezi in identifikacija receptorjev za Fc del IgY s pomočjo kokošjega normalnega seruma .....	33
Slika 11: Profil proteinov <i>M. synoviae</i> (ULB01B/P4) na membrani po elektroforezi in identifikacija receptorjev za Fc del IgY s pomočjo Fc fragmenta .....	34

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CNBr	cianogen bromid
C <sub>γ</sub>	konstantna domena težke verige imunoglobulina razreda G
C <sub>υ</sub>	konstantna domena težke verige imunoglobulina razreda Y
DIBA	encimskoimunski test ( <u>dot immunobinding assay</u> )
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EBP	puffer za prenos proteinov iz gela na membrano ( <u>elektroblotting puffer</u> )
EDTA	etilen diamin tetrocetan
Fab	podenota imunoglobulina, ki vsebuje celotno lahko in del težke verige
Fc	podenota imunoglobulina, ki vsebuje konstantne domene obeh težkih verig
FcR	receptor za Fc del imunoglobulinov
HA	hemaglutinacija
HA <sup>-</sup> /HAD <sup>-</sup>	fenotip bakterije, ki ni sposoben hemaglutinacije/hemadsorpcije
HA <sup>+</sup> /HAD <sup>+</sup>	fenotip bakterije, ki je sposoben hemaglutinacije/hemadsorpcije
HAD	hemadsorpcija
HPLC	tekočinska kromatografija z visoko ločljivostjo ( <u>high performance liquid chromatography</u> )
Ig	imunoglobulini
IgG	imunoglobulini razreda G
IgY	imunoglobulini razreda Y
IL	interlevkin
kbp	tisoč baznih parov
kDa	kilodalton, enota za molekulsko maso
Lv	lahka veriga imunoglobulinov
mAb	monoklonska protitelesa
NaDS	natrijev dodecil sulfat
NaDS-PAGE	elektroforeza v poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom
PBS	fosfatni puffer ( <u>phosphate buffer solution</u> )
pI	izoelektrična točka
TPBS	Tween 20-PBS; detergent Tween 20, redčen s fosfatnim pufrom v določenem volumskem razmerju
Tris	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol
Tv	težka veriga imunoglobulinov
V <sub>H</sub>	variabilna domena težke verige
V <sub>L</sub>	variabilna domena lahke verige
VlhA	<u>v</u> ariabilni <u>l</u> ipoproteinski <u>h</u> emaglutinin
<i>vlhA</i>	gen za VlhA

## 1 UVOD

Bakterija *Mycoplasma synoviae* je ena izmed pomembnejših ptičjih patogenih mikoplazem. Pogosto povzroča okužbe zgornjega dihalnega trakta pri kokoših in puranih, ki pa v glavnem potekajo brez izraženih bolezenskih znamenj. Včasih okužba privede tudi do kužnega (infekcijskega) sinovitisa, ki se kaže predvsem kot vnetje v sklepkih. V intenzivni perutninski proizvodnji so lahko posledice okužbe ekonomske izgube, ker se zmanjšata prirast in nesnost. Okužba z *M. synoviae* pogosto postane kronična. Menijo, da imajo pri tem vlogo tudi spremenljivi površinski antigeni *M. synoviae*, ki omogočajo izogibanje imunskemu odzivu (Noormohammadi in sod., 1997; Benčina in sod., 1999; Kleven, 2003; Bradbury, 2005).

Tako kot pri vseh vretenčarjih, je tudi pri kokoših imunski sistem dobro razvit. Naravna (prirojena) in specifična (pridobljena) imunost, pri kateri nastajajo tudi protitelesa proti imunogenim proteinom, se med seboj dopolnjujeta. Večinska serumska protitelesa pri pticah so imunoglobulini razreda Y (IgY), ki so po strukturi in funkciji homologna sesalčjim imunoglobulinom razreda G (IgG). Zaradi svojih lastnosti imajo kokošji IgY pred sesalčjimi IgG določene prednosti pri uporabi v raziskovalne, diagnostične in terapevtske namene. K temu pripomoreta še preprosto pridobivanje IgY iz jajčnega rumenjaka, poleg tega je možno proizvesti tudi kokošja monoklonska protitelesa (Warr in sod., 1995; Matsushita in sod., 1998; Matsuda in sod., 1999; Carlander, 2002; Tini, 2002; Narat, 2003).

Vendar se protitelesa ne vežejo vedno le specifično na antigene patogenih bakterij. Številne bakterije imajo na svoji površini molekule, ki nespecifično vežejo protitelesa preko njihovih Fc delov, ki sicer ne sodelujejo pri prepoznavanju in vezavi na antigen. To so receptorji za Fc del imunoglobulinov (FcR). Prvi dokazan in najbolj znan bakterijski FcR je protein A bakterije *Staphylococcus aureus*. Skupaj s proteinom G streptokokov skupine C in G, prav tako FcR, sta postala zelo uporabna v biokemiji in imunologiji, npr. kot označena reagenta za zaznavanje protiteles in njihovo izolacijo. Oba proteina vežeta z močno afiniteto le določene razrede in podrazrede sesalčjih imunoglobulinov, ne pa tudi kokošjih IgY (Forsgren in Sjöquist, 1966; Kronvall, 1973; Lauerman in Reynolds-Vaughn, 1991; Sauer-Eriksson in sod., 1995).

Glede na to, da je *M. synoviae* kokošja patogena bakterija, ni bilo čudno, da je bil pri njej prvič dokazan obstoj FcR, ki močno vežejo kokošje IgY. Dokazana sta bila dva FcR s približnima molekulskima masama 80 kDa in 90 kDa (Lauerman in Reynolds-Vaughn, 1991). V svoji raziskavi so Lauerman in sod. (1993) ugotovili, da se vrednosti molekulskih mas obeh FcR pri različnih sevih *M. synoviae* nekoliko razlikujejo in se gibljejo v razponu  $81 \pm 2,0$  kDa in  $90 \pm 2,6$  kDa. Predvideva se, da je vloga bakterijskih FcR oslabitev humoralnega (protitelesnega) imunskega odziva, vendar pri *M. synoviae* njihova vloga pri patogenezi ni razjasnjena (Lockaby in sod., 1998; Carlander, 2002).

## 1.1 NAMEN DELA

Namen dela je bila identifikacija proteinov pri bakteriji *Mycoplasma synoviae*, ki vežejo kokošje IgY nespecifično oziroma neimunsko preko Fc dela. FcR smo nameravali določiti pri sevu ULB01B/P4 *M. synoviae*, ki je bil izoliran iz dihal kokoši v Sloveniji (Benčina in sod., 2001). Iz predhodnih objav je sicer razvidno, da pri tej vrsti obstajata vsaj dva FcR, katerih molekulske mase pa nekoliko variirata pri različnih sevih. Tako smo FcR nameravali identificirati glede na molekulsko maso. Predvidevali smo, da bomo po ločitvi proteinov *M. synoviae* s pomočjo elektroforeze v poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom (NaDS-PAGE) in njihovem prenosu na membrano, z encimskoimunskim testom uspeli identificirati proteine, ki vežejo kokošje IgY neimunsko. Hkrati smo predvidevali, da bomo uspešno pridobili Fc fragment kokošnjih IgY, ki ga bomo uporabili kot detekcijski reagent za FcR, vendar smo morali na koncu uporabiti komercialni Fc fragment.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 MIKOPLAZME

Mikoplazma je splošno poimenovanje za pripadnika razreda *Mollicutes*. Glavna značilnost predstavnikov tega razreda je odsotnost celične stene, kot pove že samo ime (latinsko *mollis* – mehek, *cutis* – koža). Njihova posebnost je tudi v tem, da so najmanjši znani prokarioti, ki so sposobni samostojnega razmnoževanja. Njihove celice so velike od 0,2 do 0,5  $\mu\text{m}$  in so kokoidne oblike, pojavljajo se tudi paličaste, filamentozne in obročaste oblike (Razin in sod., 1998; Kleven, 2003; Bradbury, 2005).

V skladu z velikostjo celic je majhen tudi njihov genom, ki pri rodu *Mycoplasma* obsega nekje med 580 kbp (*Mycoplasma genitalium*) in 1380 kbp (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC). Genom *Mycoplasma genitalium* (ki je bil eden prvih sekvenciranih bakterijskih genomov) naj bi bil zelo blizu najmanjši količini DNA, ki še omogoča življenjske procese. Sekvenciran genom *M. synoviae* 53 (Vasconcelos in sod., 2005) obsega okrog 800 kbp. Mikoplazme so se z reduktivno evolucijo razvile iz grampozitivnih bakterij z nizkim odstotkom G+C baznih parov. V tem procesu so med drugim izgubile gene, ki sodelujejo v biosintetskih poteh in sintezi celične stene. Posledice redukcije genoma so počasnejša sinteza proteinov in počasnejša rast ter odvisnost od gostiteljevih hranil (aminokislin, vitaminov, purinov, pirimidinov, maščobnih kislin, sterolov), izven katerega ne morejo preživeti dalj časa (Razin in sod., 1998; Rottem in Naot, 1998; Madigan in sod., 2003; Bradbury, 2005).

Mikoplazme so v naravi široko razširjene kot paraziti ljudi, sesalcev, plazilcev, dvoživk, rib, členonožcev in rastlin. Primarno okolje človeških in živalskih mikoplazem so sluznice dihalnega in urogenitalnega trakta, oči, prebavil, mlečnih žlez in sklepov. Okužbe, ki jih povzročajo, so navadno blage in kronične, poškodbe so najverjetneje posledica vnetja in imunskega odziva, ki škoduje tkivu gostitelja (Razin in sod., 1998).

V rodu *Mycoplasma* je preko 100 različnih vrst, ki so patogene za ljudi ali živali; tako se skoraj vse veterinarsko pomembne mikoplazme uvrščajo sem. Med njimi so štiri patogene vrste, ki povzročajo večje ekonomske izgube: *Mycoplasma iowae* in *M. meleagridis* pri puranih ter *M. synoviae* in *M. gallisepticum* pri kokoših in puranih, ki sta razširjeni širom sveta (Razin in sod., 1998; Bradbury, 2005).

Gojenje mikoplazem v pogojih *in vitro* je zahtevno, rast pa počasna. Mikoplazme potrebujejo navadno s proteinom bogat medij z 10-15 % živalskega seruma, ki je med drugim tudi vir maščobnih kislin in holesterola za celično membrano. *M. synoviae* potrebuje še nikotinamid adenin dinukleotid (NAD). Po treh do desetih dneh gojenja pri 37 °C se tvorijo kolonije na agarju. Tipične kolonije so majhne (0,1-1,0 mm), gladke, okrogle in imajo osrednjo izboklino (Razin in sod., 1998; Kleven, 2003).

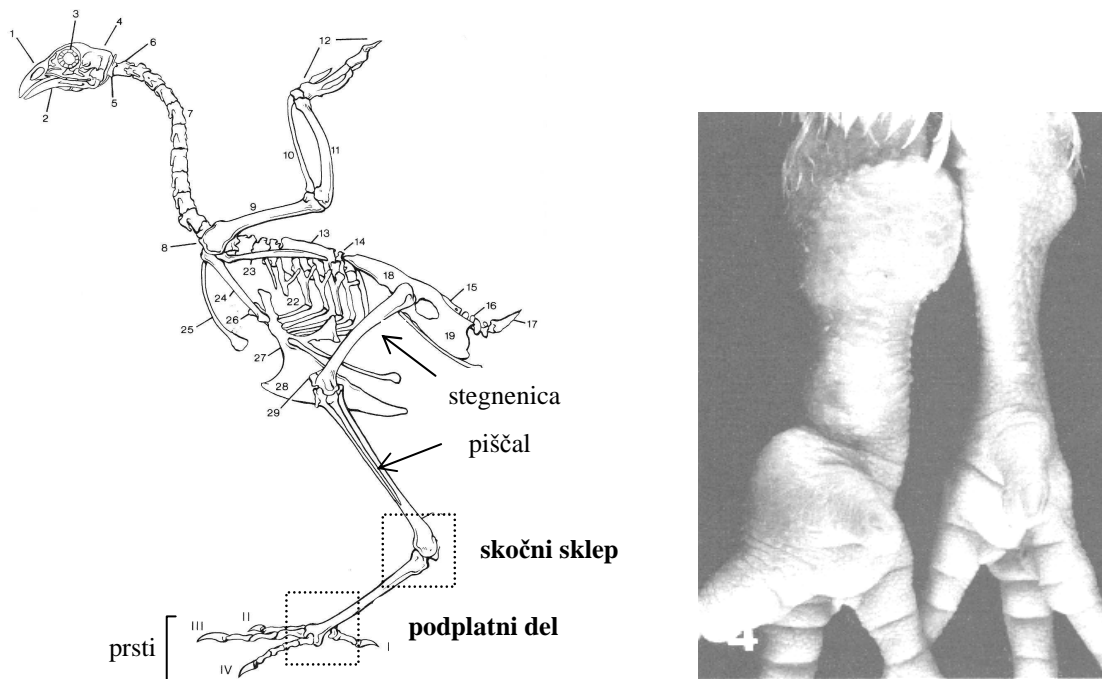
### **2.1.1 Okužba z bakterijo *Mycoplasma synoviae***

Najpogosteje povzroča okužbo zgornjega dihalnega trakta, ki poteka brez izraženih kliničnih znamenj. V kombinaciji z atipično kokošjo kugo in/ali kužnim bronhitisom lahko privede do poškodb zračnih vreč. Včasih okužba napreduje do dihalne bolezni, kužnega (infekcijskega) sinovitisa ali postane sistemska, kar se kaže v patoloških spremembah številnih organov (Kleven, 2003).

Kužni sinovitis je akutna ali kronična bolezen kokoši in puranov, ki zajame predvsem sinovialne membrane sklepov in kitne ovojnice in povzroči vnetje ovojnic sklepov (sinovitis), vnetje kitnih ovojnic (tendovaginitis) ali vnetje sluzne vrečice (bursitis). Akutna okužba navadno nastopi pri 4-16 tednov starih piščancih in 10-24 tednov starih puranih. Občasno pride do akutne okužbe tudi pri odraslih kokoših. Običajno sledi kronična okužba, ki lahko traja celotno življenje. Klinična znamenja se kažejo v zmanjšani rasti, bledem grebenu, oteklinah sklepov, ohromelosti. Pogosti so prsni žulji, v glavnem so prizadeti sklepi na nogah. Smrtnost pri sinovitisu je največkrat od 5 do 15 odstotna, lahko pa niha od 2 do 75 odstotkov (Kleven, 2003).

Kužni sinovitis pri puranih in kokoših še vedno povzroča ekonomske izgube v intenzivni perutninski proizvodnji, kar je posledica zmanjšane rasti in odstranitve pri zakolu zaradi neprimernosti za živilo, vključeni pa so tudi stroški za preventivo in kontrolo. Okužba z *M. synoviae* se prenaša vertikalno skozi valilna jajca, horizontalno pa poteka prenos kontaktno preko dihalnega trakta. Okužbe na komercialnih farmah brojlerjev, nesnic in puranov so še vedno problematične po vsem svetu (Salisch in sod., 2000; Kleven, 2003; Bradbury, 2005; Dufour-Gesbert in sod., 2006; Ramírez in sod., 2006).

Pogostost okužbe pri nesnicah potrjuje tudi epidemiološka študija (Dufour-Gesbert in sod., 2006), ki so jo izvedli na perutninskih farmah kokoši v Franciji. Pri 68 % preiskanih jat so z odvzemom brisa trahej ugotovili prisotnost *M. synoviae*. Rezultati so pokazali tudi, da je bila smrtnost kokoši v okuženih jatah v primerjavi z neokuženimi jatah višja in produkcija jajc nižja, čeprav te razlike niso bile statistično pomembne.



**A**

**B**

**Slika 1:** Sklepi na nogah, ki jih kužni sinovitis najpogosteje prizadene. (A) Sklepi so označeni na shemi kokošje noge (Narat in sod., 1998; Dyce in sod., 2002, str. 802). (B) Leva kokošja noga po inokulaciji v stopalo z *M. synoviae* (sev K1858) in zdrava desna noga (Lockaby in sod., 1998, str. 182). Od vseh mikoplazem, ki so patogene za perutnino, ima *M. synoviae* največjo afiniteto za sklepe, čeprav se včasih zgodi, da imajo ptice le splošno okužbo brez oteklih sklepov (Kleven, 2003; Bradbury, 2005).

#### 2.1.1.1 Patogeni dejavniki *M. synoviae*

Posamezni sevi (izolati) *M. synoviae* se med seboj razlikujejo po patogenosti; nekateri ne povzročijo nobenih bolezenskih znamenj, spet drugi kužni sinovitis. Seveda lahko na potek okužbe v naravnem okolju vplivajo tudi okoljski dejavniki (prisotnost virusov, bakterij, prahu, nizka temperatura) (Lockaby in sod., 1998, 1999; Kleven, 2003). Pri eksperimentalni okužbi brojlerjev s šestimi različnimi izolati so le te razvrstili kot patogene, zmerno patogene in blago patogene glede na razlike v poškodbah tkiv in okužbe različnih tkiv (Lockaby in sod., 1998). Kasneje so želeli ugotoviti, kateri dejavniki so odgovorni za razlike v patogenosti posameznih sevov, a jim to ni uspelo. Kot možen patogeni mehanizem so omenili izogibanje imunoglobulinom (Ig) s pomočjo receptorjev za Fc del Ig (točka 2.4.1), vendar so domnevali, da naj ne bi imeli vpliva na razlike v patogenosti sevov (Lockaby in sod., 1999).

Pritrditev (adhezija) je pogoj za kolonizacijo tkiv in okužbo, zato je pomemben patogeni dejavnik pri mikoplazmah prisotnost citadhezinov, ki omogočijo pritrnitev na gostiteljsko celico (Razin in sod., 1998). Lockaby in sod. (1999) so pri vseh testiranih sevih *M. synoviae* identificirali protein z molekulsko maso 45 kDa, ki je navzkrižno reagiral s kokošjim serumom proti P1 adhezinu *Mycoplasma pneumoniae*, verjetno najbolj proučenim adhezinom pri mikoplazmah, ki ima vlogo tudi pri hemadsorpciji. Vendar so Berčič in sod. (2007) ugotovili, da je ta protein *M. synoviae* elongacijski faktor Tu (EF-Tu), ki pa je citoplazemski protein in tako pri pritrditvi verjetno ne sodeluje (Benčina in sod., 1999).

Kot kaže, imajo samo tiste vrste rodu *Mycoplasma*, ki so pomembnejše perutninske patogene bakterije, sposobnost hemaglutinacije (HA) in/ali hemadsorpcije (HAD) eritrocitov (Benčina, 2002; Kleven, 2003). Tudi med kloni posameznega izolata *M. synoviae* prihaja do razlik v patogenosti. V raziskavi, ki so jo izvedli Narat in sod. (1998), je HA pozitivna (HA<sup>+</sup>) populacija seva AAY4 povzročila akutni sinovitis signifikantno bolj pogosto kot HA negativna (HA<sup>-</sup>) populacija istega seva.



## 2.2 IMUNSKI SISTEM

Imunski sistem predstavlja obrambo pred vdirajočimi mikroorganizmi in se pri pticah ne razlikuje veliko od imunskega sistema pri sesalcih. V prvi vrsti je naravna imunost, ki vključuje anatomske pregrade, kot so: koža in sluznice; nespecifične baktericidne snovi, npr. lizocim v solzah in beljaku; fagocitoza in znotrajcelično uničenje mikroorganizmov; komplementni sistem (Vozelj, 2000; Carlander, 2002). Ko so Lockaby in sod. (1998) kokoši načrtno okužili z različnimi izolati *M. synoviae*, so ti povzročili večje poškodbe, ko so bili inokulirani v stopala v primerjavi z inokulacijo na sluznico oči. Slednje so naletele na več obrambnih mehanizmov naravne imunosti (mehanska odstranitev z vekami, sluznični epitelij nosu in trahej).

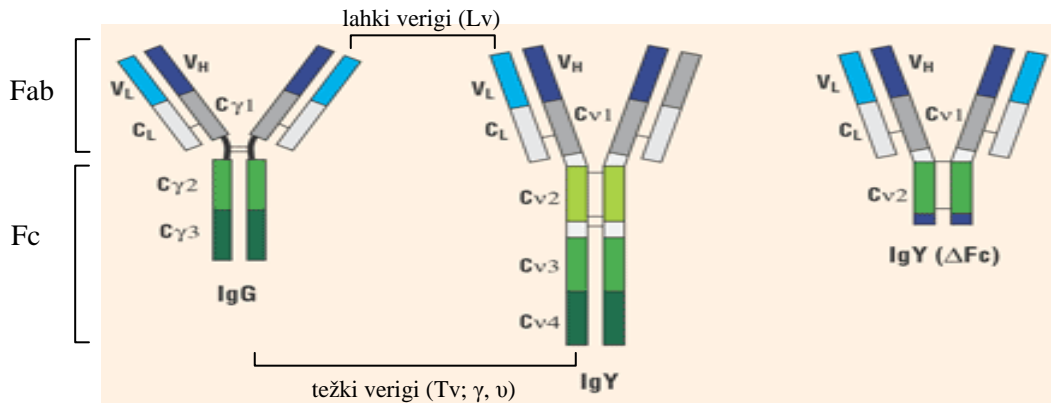
Ker je naravna imunost včasih nezadostna, se je pri vretenčarjih razvila še pridobljena imunost, ki lahko specifično prepozna in odstrani tuje snovi ali mikrobe. Dodatno se deli na humoralno imunost, ki jo predstavljajo protitelesa, ki jih proizvajajo celice B in delujejo proti zunajceličnim patogenom ter na celično posredovano imunost, ki jo predstavljajo citotoksične celice T. Omogoča tudi nastanek imunskega spomina, da lahko organizem ob naslednjem vdoru tujka ali mikroba hitreje in učinkoviteje odreagira. Za razvoj te imunosti pa je potrebno vzajemno sodelovanje z mehanizmi naravne odpornosti (Vozelj, 2000)

### 2.2.1 IgG in IgY

IgG in IgY sta glavni serumski nizkomolekularni protitelesi, ki sta pomembni pri sistemskih okužbah pri sesalcih (IgG) oziroma pri ptičih, plazilcih, dvoživkah in ribah pljučaricah (IgY). Sta funkcionalna in strukturna ekvivalenta. IgY je evolucijski predhodnik sesalčjih IgG in IgE, najboljše pa je proučen pri kokoših (Warr in sod., 1995; Narat, 2003).

Oba imunoglobulina sta sestavljena iz dveh lahkih (Lv) in dveh težkih (Tv) polipeptidnih verig, kot prikazuje slika 2. Glavna razlika med IgG in IgY je v številu konstantnih domen v težki verigi. IgY ima štiri konstantne domene (C $\nu$ 1 – C $\nu$ 4), IgG pa le tri (C $\gamma$ 1 – C $\gamma$ 3). Tako ima težka veriga pri IgY nekoliko večjo molekulsko maso (67-

70 kDa) kot pri IgG (okoli 50 kDa). Molekulska masa IgY je približno 180 kDa in IgG približno 150 kDa. Domeni C $\nu$ 3 in C $\nu$ 4 sta ekvivalentni C $\gamma$ 2 in C $\gamma$ 3, medtem ko v  $\gamma$  verigi ni prisotne domene, ki bi bila ekvivalentna C $\nu$ 2. Iz te domene je verjetno med evolucijo nastal zglob pri sesalčjem IgG, ki mu omogoča večjo fleksibilnost kot IgY, saj je lahko med Fab deloma kot tudi do 180° (Warr in sod., 1995; Vozelj, 2000).



**Slika 2:** Primerjava zgradb IgG in IgY (Chiou, 2002). Na sliki so s C označene konstantne domene in z V variabilne domene lahkih in težkih verig. IgY( $\Delta$ Fc) je krajša oblika IgY, ki se lahko pojavi pri racah in gosih (Warr in sod., 1995). Površina IgY je bolj hidrofobna kot pri IgG. To je v skladu s tem, da ima IgY večji Fc del, ki predstavlja najbolj hidrofoben del imunoglobulinske molekule (Dávalos-Pantoja in sod., 2000).

### 2.2.1.1 Podenote imunoglobulinov

Vsaka temeljna enota imunoglobulina je sestavljena iz treh podenot. S proteolitičnim encimom papainom je mogoče tako IgG kot IgY razcepiti na posamezne podenote, in sicer na dva Fab fragmenta ter Fc fragment. Vsak Fab fragment sestavljata celotna lahka veriga in tisti del težke verige, ki vsebuje tudi variabilno domeno ( $V_H$ ), Fc fragment pa sestavljata dela obeh težkih verig s konstantnimi domenami (Vozelj, 2000; Suzuki in Lee, 2004).

Suzuki in Lee (2004) sta z masno spektrometrijo po razgradnji kokošjih IgY s papainom določila velikost Fab fragmenta ( $V_L + V_H + C_L + C_{\nu 1}$ ; slika 2) na približno 45 kDa. Velikost Fc fragmenta – približno 54 kDa – je ustrezala teoretični masi dimera C $\nu$ 3 in C $\nu$ 4 brez C $\nu$ 2 domene, ki se je morda izgubila zaradi prekomerne razgradnje.

Fc fragment je bil po elektroforezi na poliakrilamidnem gelu s pomočjo protiteles proti kokošnjemu Fc delu IgY pod reducirajočimi pogoji zaznan kot oster pas, pod nereducirajočimi pogoji pa so bili vidni trije pasovi, kar pripisujejo delni redukciji disulfidnih vezi ali različnemu cepljenju s papainom.

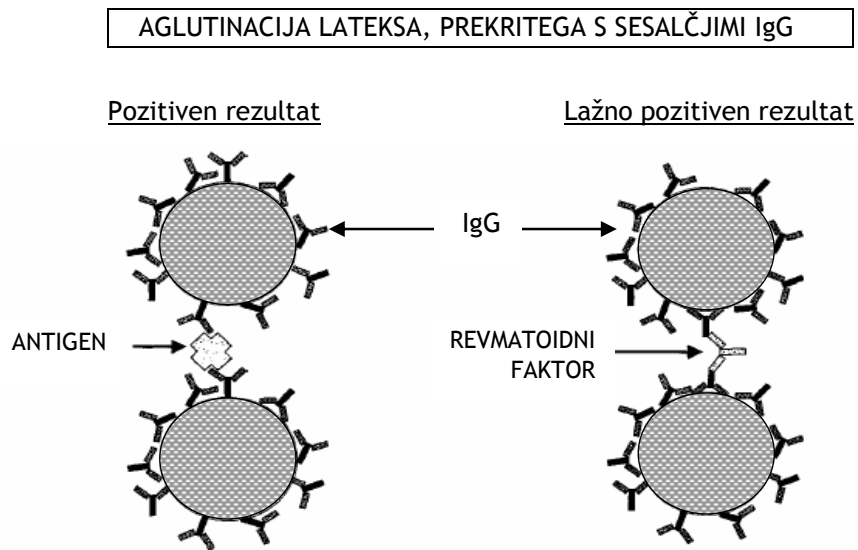
Fab del imunoglobulina opravlja primarno funkcijo protiteles; specifično vezavo z antigenom. Vezavo z epitopom antigena omogoča vezišče, ki ga tvorita variabilni domeni lahke in težke verige ( $V_L$  in  $V_H$ ). Fc del protiteles ima efektorske funkcije; tako je Fc del IgG pomemben za aktivacijo komplementa in opsonizacijo, kar pospešuje fagocitozo, Fc del IgY pa ima enako vlogo pri kokoših. Poleg tega je Fc del Ig tisti, ki omogoča prehod imunoglobulinov iz materine krvi v zarodek tako pri sesalcih kot pri kokoših (Loeken in Roth, 1983; Vozelj, 2000; Carlander, 2002; West in sod., 2004).

### 2.2.2 Uporaba IgY

Glavna razlika v strukturi IgY in IgG molekul se nahaja v Fc delu in vpliva na njune različne lastnosti. Tako protitelesa IgY za razliko od IgG:

- ne aktivirajo človeškega komplementnega sistema (Larsson in sod., 1992),
- ne reagirajo z Fc receptorji na človeških krvnih celicah (Schmidt in sod., 1993),
- ne vežejo človeškega revmatoidnega faktorja (RF), ki je avtoprotitelo proti Fc delu sesalčjega IgG (Dávalos-Pantoja in sod., 2000),
- ne vežejo človeških protiteles proti mišjim protitelesom (HAMA) (Carlander in Larsson, 2001),
- ne vežejo bakterijskih proteinov – stafilokoknega proteina A in streptokoknega proteina G (Tini in sod., 2002).

Zaradi tega imajo IgY določeno prednost pred IgG pri uporabi v diagnostiki in raziskavah. Klinične preiskave navadno temeljijo na serumih, ki vsebujejo aktivni komplement, v preiskovanih serumih in tkivih so lahko prisotna tudi protitelesa, za katera ne želimo, da bi reagirala z diagnostičnimi sesalčjimi IgG. Posledica tega so možni lažno pozitivni ali lažno negativni rezultati, kot je npr. prikazano na sliki 3 (Tini in sod., 2002; Narat, 2003).



**Slika 3:** Primer lažno pozitivnega rezultata pri aglutinaciji lateksa (Dávalos-Pantoja in sod., 2000, str. 658). Delci lateksa so prekriti s sesalčjimi IgG, ki se lahko s svojimi Fc deli vežejo z revmatoidnim faktorjem, če je prisoten v preiskovanem vzorcu. Posledica je lažno pozitiven rezultat, ki je viden kot aglutinacija delcev lateksa.

IgY so primerni tudi kot terapevtska protitelesa za peroralno zaužitje, kot nadomestilo za antibiotike. Pri tem je pomembno, da ne aktivirajo človeškega komplementnega sistema in se ne vežejo na človeške Fc receptorje. Te reakcije bi lahko namreč posredovale vnetje v gastrointestinalnem traktu (Carlander in sod., 2000).

Dodatna prednost kokošjih IgY je v hitri in preprosti izolaciji poliklonskih protiteles iz jajčnega rumenjaka, kamor se v prvem koraku prenašajo iz kokošje krvi za pasivno imunizacijo zarodka. Poleg tega so bila uspešno pripravljena že tudi kokošja monoklonska protitelesa (Kowalczyk in sod., 1985; Matsushita in sod., 1998; Matsuda in sod., 1999; Tini in sod., 2002).

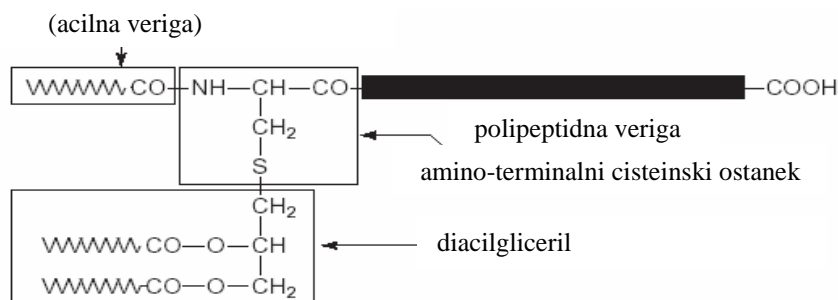
Nekaj prednosti IgY pred IgG je povzetih v preglednici 1.

**Preglednica 1:** Nekaj lastnosti IgY, ki jim dajejo prednost pri uporabi pred IgG (Narat, 2003).

<b>Prednosti</b>	<b>Vir</b>
<i>Pridobivanje</i> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Enostavna in poceni skrb za kokoši.</li><li>▪ Izolacija iz jajčnega rumenjaka je neinvazivna in neboleča za žival.</li><li>▪ V rumenjaku se nahaja samo Ig razreda Y.</li></ul>	Tini in sod., 2002 Narat, 2003
<i>Velik izkoristek</i> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ V primerjavi s serumom manjših živali je možno iz rumenjaka pridobiti večje količine Ig.</li><li>▪ Posledično zadostuje manjše število živali/kokoši.</li></ul>	Narat, 2003
<i>Obstojnost</i> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Aktivnost se ohrani še 6 mesecev pri sobni temperaturi ali en mesec pri 37 °C.</li></ul>	Narat, 2003
<i>Zmanjšanje nespecifične vezave v ozadju</i> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Ni navkrižne reaktivnosti med IgY in IgG; zato sekundarna protitelesa proti kokošjim IgY ne reagirajo z drugimi IgG v vzorcu.</li></ul>	Schmidt in sod., 1993
<i>Evolucijska oddaljenost</i> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Možnost tvorbe protiteles proti ohranjenim sesalčjim proteinom.</li></ul>	Gassmann in sod., 1990

### 2.3 HUMORALNI IMUNSKI ODZIV NA *M. synoviae*

Kokoši se na okužbo z mikoplazmami odzovejo z aktivacijo imunskega odziva, ki vodi tudi k tvorbi protiteles. Humoralni imunski odziv se s časom okrepi – poveča se število specifičnih IgY in proteinov, s katerimi se IgY vežejo; te reakcije pa postanejo tudi bolj intenzivne (Avakian in sod., 1992; Narat in sod., 1998). Pri mikoplazmah predstavljajo proteini kar več kot dve tretjini membranske mase, ostalo so membranski lipidi. V relativno večji količini kot pri ostalih prokariotih so prisotni membranski lipoproteini (slika 4), ki naj bi bili glavna tarča humoralnega imunskega odziva (Razin in sod., 1998).



**Slika 4:** Sestava bakterijskega lipoproteina (Chambaud in sod., 1999, str. 495). Amino-terminalni cisteinski ostanek je preko tioestrške vezi povezan z diacilglicerilom, kar je značilno za vse bakterijske lipoproteine. Cisteinski ostanek je včasih še preko amidne vezi povezan s tretjo acilno verigo maščobne kisline (Chambaud in sod., 1999), kar pa pri rodu *Mycoplasma* ni verjetno (Lavrič in sod., 2007). V odsotnosti periplazmatskega prostora je pritrnitev proteinov preko acilnih verig način, da ostanejo na površini membrane (Razin in sod., 1998).

Raziskave so pokazale, da z antiserumi proti *M. synoviae* reagirajo tako nekateri membranski kot nekateri celični proteini (Gurevich in sod., 1995). Pri raziskavi, ki so jo izvedli Bradley in sod. (1988), je s homolognim referenčnim antiserumom reagiralo približno 20 proteinov *M. synoviae* z molekulskimi masami od 20,7 kDa do 275 kDa.

Membranski lipoprotein in hemaglutinin VlhA je glavni imunogen *M. synoviae*. Z izjemo nekaterih sevov se VlhA posttranslacijsko cepi na karboksi-terminalni (C-terminalni) del MSPA z velikostjo 50 kDa in amino-terminalni (N-terminalni) del MSPB z velikostjo 45 kDa; pri posameznem sevu pa obstaja več njunih oblik (Noormohammadi in sod., 1997, 1998). V zgodnji fazi eksperimentalno povzročene kužnega sinovitisisa je bil protitelesni odziv močnejši proti MSPB (oziroma proti tMSPB, njegovi krajši obliki, ki je značilna za HA<sup>-</sup> klone) (Narat in sod., 1998). V nasprotju s protitelesi proti MSPB lahko tista proti MSPA inhibirajo hemaglutinacijo. Serumaska protitelesa je mogoče s testom inhibicije hemaglutinacije (HI) dokazati šele po daljšem času od začetka okužbe, najmanj po treh tednih (Noormohammadi in sod., 1997; Lockaby in sod., 1998).

MSPB in tMSPB sta lipoproteina (slika 4) (Noormohammadi in sod., 1998). Zaenkrat je bilo dokazano, da vsaj *in vitro* lahko sprožita izločanje dušikovega monoksida (NO) ter proinflammatoryh citokinov interleukina-6 (IL-6) in IL-1 $\beta$  pri makrofagih (Lavrič in sod., 2007). IL-1 $\beta$  aktivira med drugim makrofage in T limfocite in posledično vodi do

sinteze drugih citokinov in kemokinov, tudi IL-6, ki aktivira tudi B in T limfocite (Wigley in Kaiser, 2003). Predvidevajo, da bi izločanje IL-1 in IL-6 lahko imelo povezavo z vnetnimi procesi v akutni fazi kužnega sinovitisisa kot tudi pri imunskem odzivu, kar je v skladu z zgodnjim in močnim protitelesnim odzivom na MSPB/tMSPB (Lavrič in sod., 2007).

### 2.3.1 Antigenska spremenljivost

Večina vrst rodu *Mycoplasma* (med njimi tudi vrste, ki so patogene za perutnino) ima sposobnost spreminjanja glavnih površinskih antigenov, kar je verjetno sredstvo za prilagoditev na različne okoliščine, med drugim tudi na imunski sistem (Chambaud in sod., 1999; Benčina, 2002; Bradbury, 2005).

Spreminjanje hemaglutininskih lipoproteinov je značilno tako za *M. synoviae* kot *M. gallisepticum*. Mogoče je to razlog, da kolonizacija zgornjega dihalnega trakta kljub močnemu protitelesnemu odzivu vztraja in okužba postane kronična (Noormohammadi in sod., 2000; Benčina, 2002; Bradbury, 2005).

Sprememba v izražanju MSPA in MSPB je povezana s sposobnostjo hemadsorpcije (HAD) in hemaglutinacije (HA). Za razliko od HAD<sup>+</sup> fenotipa namreč MSPA in MSPB pri HAD<sup>-</sup> fenotipu nista izražena. V tem primeru je močnejše izražena skrajšana oblika MSPB (tMSPB; 25-30 kDa) (Noormohammadi in sod., 1997; Benčina in sod., 1999, 2001).

Kljub redukciji genoma imajo mikoplazme veliko kapaciteto za antigensko spremenljivost (Razin in sod., 1998). Čeprav obstaja le ena popolna kopija gena *vlhA*, se MSPB proteini pri posameznih izolatih in znotraj istega klona razlikujejo po velikosti in antigenskih determinantah. To lahko pripišemo rekombinaciji *vlhA* s pseudogeni, ki poteka približno od prve tretjine proteina MSPB naprej. Obstaja namreč le ena popolna kopija gena *vlhA*, v genomu je edinstven 5' konec *vlhA*, ki kodira približno tretjino proteina MSPB (Noormohammadi in sod., 1997, 2000; Benčina in sod., 2001).

### 2.3.2 Navzkrižna reaktivnost

Včasih se lahko protitelesa vežejo tudi s heterolognim antigenom, ki ima podoben epitop kot homologni antigen, proti kateremu so bila protitelesa proizvedena. Gre za navzkrižno reakcijo (Madigan in sod., 2003). Nekatero skupno epitope imata tudi *M. synoviae* in *M. gallisepticum* (Berčič in sod., 2007). Zato protitelesa proti antigenom ene vrste tudi navzkrižno reagirajo z antigeni druge vrste, kar je problematično pri serološki diagnostiki. Zaradi skupnega gostitelja in afinitete do tkiva, je ta problem le še večji (Gurevich in sod., 1995; Kleven, 2003).

O navzkrižnih reakcijah med *M. synoviae* in *M. gallisepticum* so poročali že Bradley in sod. (1988), ko je antiserum proti *M. gallisepticum* reagiral z nekaj proteini *M. synoviae*, intenzivnejša reakcija je bila s proteinoma z molekulskima masama 53 kDa in 88 kDa. Antiserum proti proteinu *M. synoviae* (sev F10-2AS) z molekulsko maso 41 kDa je reagiral z 42 kDa velikim proteinom *Mycoplasma iowae* (serotip N) (Avakian in sod., 1992). V raziskavi Gurevicha in sod. (1995) skupina proteinov *M. synoviae* (sev WVU-1853), ki jih z elektroforezo ni bilo mogoče ločiti na posamezne pasove in so zavzemali velikosti od 46 kDa do 52 kDa, niso reagirali z antiserumom proti *M. gallisepticum*. Po drugi strani pa je protein *M. synoviae* (F10-2AS) z molekulsko maso 41 kDa (MSPB), katerega velikost pri različnih sevih variira, navzkrižno reagiral tudi s serumi proti drugim kokošjim patogenim bakterijam (Avakian in Kleven, 1990; Benčina, 2002). Antiserum proti P1 adhezinu *Mycoplasma pneumoniae* je prav tako reagiral s 45 kDa velikim proteinom pri šestih izolatih *M. synoviae* (Lockaby in sod., 1999), za katerega se je izkazalo, da je elongacijski faktor Tu (EF-Tu) *M. synoviae* (Berčič in sod., 2007).

Noormohammadi in sod. (1998) so omenili možnost, da je homologija med hemaglutininskima genskima družinama *M. synoviae* in *M. gallisepticum* posledica horizontalnega prenosa, ki ga omogoča bivanje v istem gostitelju. S hibridizacijo so v genomu *M. gallisepticum* S6 odkrili regije, ki so podobne genu *vlhA*. Primerjava nukleotidnega zaporedja *vlhA* z zaporedjem pMGA1.7, prekursorjem hemaglutinina *M. gallisepticum* S6, je pokazala visoko stopnjo identičnosti. Primerjava sekvenciranih



genomov *M. synoviae* (Vasconcelos in sod., 1995) ter *M. gallisepticum* (Papazisi in sod., 2003) dodatno potrjuje prenos genov za hemaglutinine med *M. synoviae* in *M. gallisepticum*.

## 2.4 BAKTERIJSKI RECEPTORJI ZA Fc DEL IMUNOGLOBULINOV

Vezava protiteles na imunogene bakterijske proteine in druge antigene (npr. LPS) je del specifične obrambe pred vdorom patogenov. Znano pa je, da imajo številne bakterije na svoji površini molekule, ki lahko vežejo Ig različnih razredov, podrazredov in živalskih vrst preko Fc dela (Forsgen in Sjöquist, 1966; Kronvall, 1973). FcR pri bakterijah, izoliranih iz človeških vzorcev, bodo imeli močno afiniteto za človeške imunoglobuline in zaradi podobne strukture morda tudi za druge sesalčje Ig. Bakterije, ki so izolirane iz ptic pa bodo verjetno imele FcR za ptičje imunoglobuline (Carlander, 2002). Najbolj znana FcR sta protein A bakterije *Staphylococcus aureus* in protein G streptokokov skupine C in G. Vezava z različnimi Ig je prikazana v preglednici 2.

Prva sta neimunsko vezavo med Ig in bakterijskimi proteini leta 1966 dokazala Forsgen in Sjöquist pri proteinu A. Pred tem so zaradi vedno prisotnih reakcij med proteinom A in človeškim serumom domnevali, da gre za imunsko reakcijo in da protitelesa proti proteinu A nastajajo zaradi stalne izpostavljenosti bakteriji *S. aureus*. Ugotovila sta, da so s proteinom A reagirali tudi IgG, ki so izhajali iz mielomske celične linije. Redukcija IgG na lahke in težke verige ter razgradnja s papainom na Fab in Fc fragment je pokazala, da Fab del, ki vsebuje tako lahko kot del težke verige, pri vezavi proteina A ne sodeluje. To pomeni, da pri vezavi IgG s proteinom A ne gre za specifično imunsko reakcijo. Dokazali so, da se je protein A vezal z Fc fragmentom IgG.

Proteina A in G imata več homolognih ponovitev, ki lahko vežejo Fc del, ni pa nobene zaporedne ali strukturne homologije pri ponovitvah med proteinoma. Oba proteina tekmujeta za vezavo na Fc del, ki je na zglobo med C $\gamma$ 2 in C $\gamma$ 3 domeno težkih verig. Vendar sta načina vezave različna; vezava s proteinom A poteka predvsem preko hidrofobnih interakcij, s proteinom G pa preko vodikovih vezi in ionskih interakcij. Protein G veže več IgG podrazredov in z večjo afiniteto kot protein A. Z določitvijo

tistih struktur, ki sodelujejo pri vezavi, je možno še izboljšati afiniteto vezavo (Sauer-Eriksson in sod., 1995).

**Preglednica 2:** Nespecifična vezava bakterijskih proteinov A in G ter receptorjev za Fc del Ig *M. synoviae* z imunoglobulini različnih živalskih izvorov, razredov in podrazredov (Lauerman in Reynolds-Vaughn, 1991; Haugland, 2005, pregl. 7.12).

Izvor imunoglobulinov	Protein A	Protein G	FcR pri <i>M. synoviae</i> *
Govedo	+	++	(+)
Maček	++	-	(+)
<b>Kokoš</b>	-	-	++
Pes	++	+	(+)
Koza	+	++	(+)
Morski prašiček	+	++	(+)
Konj	-	++	(+)
Človeški IgG	IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub> , IgG <sub>4</sub>	++	++
	IgG <sub>3</sub>	-	++
Človeški IgM, IgA, IgE	++	-	NP
Človeški IgD	-	-	NP
Mišji IgG	IgG <sub>1</sub>	-	++
	Drugi podrazredi	++	++
Svinja	++	++	-
Kunec	++	++	(+)
Podgana	-	+	-
Ovca	-	++	NP

Legenda: ++ močna vezava,  
 + zrna vezava,  
 - šibka vezava ali brez vezave

\* ++ močna vezava  
 + zrna vezava  
 (+) šibka vezava  
 - brez vezave  
 NP ni podatkov

### 2.4.1 FcR pri *M. synoviae*

O FcR pri *M. synoviae* sta prva poročala Lauerman in Reynolds-Vaughn (1991), ko sta opisala dva FcR. Tudi sicer so poročali o nespecifičnih reakcijah med proteini *M. synoviae* in normalnim kokošjim serumom (Avakian in sod., 1992).

Lauerman in sod. (1993) so pregledali skupno 77 izolatov devetih vrst ptičjih mikoplazem, da bi ugotovili prisotnost receptorjev za Fc del kokošjih IgY. Pri šestih vrstah so zaznali po enega ali dva FcR. V preglednici 3 so prikazane molekulske mase receptorjev pri posameznih vrstah.

**Preglednica 3:** Molekulske mase Fc receptorjev pri šestih vrstah ptičjih mikoplazem, kot so jih določili na podlagi različnega števila izolatov (Lauerman in sod., 1993).

Vrsta	Molekulske mase FcR (kDa)	Št. pregl. izolatov
<i>Mycoplasma synoviae</i>	81,0 ± 2,6 in 91,0 ± 2,0	9
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	74,6 ± 1,7 in 84,4 ± 1,4	4
<i>Mycoplasma gallinarum</i>	134,8 ± 3,4	27
<i>Mycoplasma pullorum</i>	129,9 ± 4,4	2
<i>Mycoplasma gallinaceum</i>	124,9 ± 3,5	28
<i>Mycoplasma iowae</i>	38,0 ± 7,5 in 50,0 ± 5,4	2

Receptorje, ki so jih skupaj z drugimi proteini mikoplazem po elektroforezi prenesli na nitrocelulozno membrano, so zaznali z vezavo kokošjih IgY, ki so jih pridobili iz SPF (specific pathogen free) kokoši. Za detekcijo receptorjev na *M. synoviae* je bilo potrebno minimalno 20 µg/mL kokošjih IgY, enako kot pri Lauermanu in Reynolds-Vaughnu (1991).

V raziskavi so Lauerman in sod. (1993) ugotovili, da kljub različnim molekulskim masam FcR pri različnih sevih ni prihajalo do bistvenih odstopanj, ki bi pomenile uvrstitev katerega seva k drugi vrsti rodu *Mycoplasma*. Zato so predlagali identifikacijo FcR kot način uvrstitve ptičjih izolatov k posameznim vrstam rodu *Mycoplasma*. Takšna identifikacija zahteva 48-urno gojenje v tekočem gojišču, čemur sledi identifikacija receptorjev na nitrocelulozni membrani.

Danes je zaradi razvoja PCR identifikacija *M. synoviae* mnogo hitrejša. Med drugim so Benčina in sod. (2001) predlagali razlikovanje izolatov *M. synoviae* na podlagi zaporedij na 5' koncu gena *vlhA*, ki omogoča tudi sledenje posameznim izolatom pri širjenju okužbe.

Fc receptorja pri *M. synoviae* sta prvič opisala Lauerman in Reynolds-Vaughn (1991). To je bilo tudi prvo poročilo o receptorju, ki močno veže kokošje IgY, saj so bili pred tem poznani le receptorji z močno afiniteto za sesalčje Ig (Forsgen in Sjöquist, 1966; Kronvall, 1973), ki so jih že uporabljali za njihovo detekcijo in izolacijo. Dokazala sta obstoj dveh FcR s približnima molekulskima masama 80 kDa in 90 kDa ter izoelektričnima točkama 5,3 in 4,3. Izpostavitve delovanju proteaz je uničila receptorsko aktivnost, medtem ko  $\alpha$ -amilaza nanjo ni imela nobenega vpliva. To nakazuje glavno proteinsko komponento receptorjev.

FcR sta imela največjo afiniteto za ptičje IgY (zaznali so močno reakcijo z afinitetno očiščenimi kokošjimi IgY, serumskimi IgY kokoši, purana, goloba in prepelice). Vezala sta se tudi s sesalčjimi IgG. Do manj močne reakcije je prišlo s človeškimi IgG, šibko so reagirali nekateri afinitetno očiščeni IgG mačk, psov, krav, koz, konj, morskih prašičkov, zajcev in človeka. Z FcR niso reagirali IgG miši, prašiča in podgan ter IgY rac in gosi. Preglednica 2 prikazuje vezavo FcR *M. synoviae* z imunoglobulini različnih izvorov, poleg sta prikazani tudi vezavi proteinov A in G z različnimi imunoglobulini.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 PRIPRAVA PROTEINOV *M. synoviae* ZA IDENTIFIKACIJO FcR

FcR pri bakteriji *M. synoviae* smo želeli dokazati z encimskoimunskim testom, zato je bilo potrebno bakterijske proteine med seboj najprej ločiti in pripraviti za izvedbo tega testa.

##### 3.1.1 *Mycoplasma synoviae*

Želeli smo identificirati FcR pri sevu *M. synoviae* ULB01B/P4. Ta sev je bil izoliran leta 2000 iz zgornjih dihal kokoši iz perutninske farme v Sloveniji (Benčina in sod., 2001) in je del zbirke mikoplazem v Laboratoriju za mikoplazmologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete. Sicer je skupaj s sorodnimi sevi dobro proučen. Tako kot npr. F10-2AS imajo ti sevi delecijo sedeminpetdesetih nukleotidov v zaporedju gena *vlhA*, kjer so s prolinom bogate ponovitve (PRR), kar rezultira v krajšem MSPB proteinu. (Benčina in sod., 2001; Benčina in sod., 2005; Slavec, 2006; Berčič in sod., 2007; Lavrič in sod., 2007). Inkubacija mikoplazem je potekala v prilagojenem Freyevem gojišču z 12-15 % svinjskega seruma (Benčina in sod., 2001), liza celic in priprava proteinov za nadaljnjo elektroforezo je bila opisana predhodno (Benčina in sod., 2005).

##### 3.1.2 NaDS elektroforeza v poliakrilamidnem gelu

Proteine v lizatu *M. synoviae* ULB01B/P4 smo ločili z enodimenzionalno poliakrilamidno elektroforezo z natrijevim dodecil sulfatom (NaDS-PAGE). Ta metoda omogoča ločitev proteinov na podlagi različno hitrega potovanja molekul skozi poliakrilamidni gel, ki je posledica različnih molekulskih mas (O'Farrell, 1975).

Vzorec lizata *M. synoviae* smo do uporabe hranili na -20 °C. Za izvedbo elektroforeze smo ga redčili s PBS pH 7,2 v razmerju 1:2. Pred nanosom na gel smo dodali še nanašalni pufer, tako da je znašalo razmerje med vzorcem *M. synoviae* in nanašalnim pufrom 3:2. Epico s tako pripravljeno mešanico smo dobro zaprli s parafilmom in jo

segrevali 4 minute na 100 °C. Nato smo v posamezno stezo nanegli po 50 µL tako pripravljene vzorca. Na dve stezi smo nanegli dve različni mešanici standardov za določitev molekulskih mas; obe proizvajalca Fermentas. PageRuler™ Protein Ladder (SM0661), ki vsebuje štirinajst proteinov z razponom molekulskih mas od 10 kDa do 200 kDa, ter PageRuler™ Prestained Protein Ladder (SM0671) s približnimi molekulskimi masami v razponu od 10 kDa do 170 kDa.

Elektroforezo smo izvedli po standardnem postopku (Lavrič in sod., 2007). Iz 30 % akrilamid/bis-akrilamida (Sigma, A-3574, ZDA) smo najprej pripravili 10 % ločevalni gel ter ga vlili med pokončni stekleni plošči. Prelili smo ga z 1 mL z vodo nasičenega n-butanola. Ko je gel polimeriziral in se strdil, smo n-butanol odlili in gel dobro sprali z destilirano vodo. Nato smo nalili še 4 % nalagalni gel in vstavili glavnik, preden se je gel strdil. Plošči z gelom smo prekrili s parafilmom in shranili v hladilniku (na 4 °C) preko noči.

Ločevanje molekul je s pomočjo elektroforetskega pufru (250 mM Tris-glicinat z 0,1 % NaDS) potekalo v nalagalnem gelu pri 30 mA in 150 V približno 3 ure ter v ločevalnem gelu pri toku 60 mA ter napetostjo 300 V približno 5 ur.

### **3.1.3 Prenos proteinov iz gela na membrano**

Po končani elektroforezi smo ločene proteine iz poliakrilamidnega gela prenesli na polivinil difluoridno (PVDF) membrano (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore, ZDA). Pri tem postopku proteini pod vplivom električnega polja migrirajo iz gela na membrano, tako da dobimo enak vzorec proteinov kot je bil v gelu (Towbin in sod., 1979).

Metodo smo izvedli po predhodno opisanem postopku (Benčina in sod., 1999). Pripravili smo osem filter papirjev in membrano v velikosti gela. Štiri filter papirje smo namočili v pufer za prenos proteinov (EBP = 10 mM CAPS – tri-cikloheksamino ena-propansulfonska kislina – v 10 % metanolu) in jih položili na anodno ploščo. Membrano, ki smo jo za nekaj sekund aktivirali v 100 % metanolu in nato namočili v

EBP, smo z licem navzgor položili na filter papirje. Nanjo smo položili gel, ki smo ga predhodno namakali v EBP 5 minut. Membrano smo označili na enakem mestu kot gel. Nazadnje smo naložili štiri filter papirje, prepojene z EBP. Med nanašanjem smo med posameznimi plastmi previdno odstranili zračne mehurčke, ki lahko motijo prenos proteinov. Plasti smo prekrili s katodno ploščo in priklopili na električno napetost, ki smo jo določili tako, da smo površino gela pomnožili z 0,8. Prenos je tekel 1 uro.

Po končanem prenosu smo tisti del membrane, ki je vseboval eno stezo vzorca proteinov *M. synoviae* in stezi z referenčnimi markerji, odrezali in pobarvali z barvilom Coomassie brilliant blue R-250 (Pharmacia, ZDA), da bi preverili uspešnost prenosa molekul.

Ostanek membrane smo 30 minut inkubirali v 0,5 % Tween 20-PBS (TPBS), s čimer smo blokirali nezasedena mesta na membrani. Ko se je posušila, smo jo shranili na 4 °C. Tako pripravljeno membrano smo lahko uporabili za encimskoimunske teste, s katerimi smo ugotavljali reakcije proteinov *M. synoviae* z imunoglobulini in njihovimi Fc deli.

## 3.2 PRIPRAVA DETEKCIJSKEGA REAGENTA ZA FcR

Odločili smo se, da bomo FcR identificirali s pomočjo receptorjevih ligandov, kokošjih IgY oziroma njihovih Fc fragmentov. Da bi izločili morebitne reakcije med Fab delom kokošjih IgY in molekulami na membrani, smo morali pridobiti in uporabiti samo Fc fragment (Lauerman in Reynolds-Vaughn, 1991).

### 3.2.1 Razgradnja kokošjih IgY s papainom

Vzorec za razgradnjo s papainom so bili kokošji IgY, predhodno izolirani iz jajčnega rumenjaka z ekstrakcijo s kloroformom v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture (Biček, 2004). Za razgradnjo smo uporabili na agarozni gel imobiliziran papain (Pierce, 20341, ZDA), ki olajša izolacijo fragmentov razgrajenih imunoglobulinov, saj lahko gel s papainom enostavno odstranimo s centrifugiranjem. Ravnali smo po priloženih navodilih.

### Raztopine

- pufer za vzorec: 20 mM natrijev fosfat, 10 mM EDTA; pH 7,0
- pufer za razgradnjo: 20 mM cistein-HCl v pufru za vzorec; pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl; pH 7,5

### Priprava vzorca IgY za razgradnjo

Izhodni vzorec kokošjih IgY smo najprej dializirali proti pufru za vzorec. Etilen diamin tetrocetan (EDTA) v tem pufru ima vlogo vezave kovinskih ionov, ki lahko negativno vplivajo na delovanje papaina. IgY smo skoncentrirali na približno 12 mg/mL, kar ustreza priporočenemu razmerju med encimom in substratom 1:100 (w/w) (Suzuki in Lee, 2004). To smo preverili s predhodno meritvijo absorbance v spektrofotometru pri 280 nm, iz katere smo dobili podatek za koncentracijo proteinov v vzorcu. Pri tem smo upoštevali, da vrednost absorbance 1,35 ustreza koncentraciji proteinov 1 mg/mL (Harlow in Lane, 1988).

### Razgradnja

Imobiliziran papain (Pierce, 20341, ZDA) smo previdno premešali in odpipetirali 0,5 mL suspenzije (ta količina vsebuje 62,5 µg papaina) v stekleno epruveto. Tik pred uporabo smo pripravili pufer za razgradnjo, s katerim smo uravnotežili imobiliziran papain. Prisotnost cisteina v pufru je pomembna za aktivnost encima, ker je odvisna od sulfhidrilne skupine. Suspenziji smo dodali 4 mL pufra za razgradnjo, centrifugirali in odpipetirali supernatant. Postopek smo ponovili še enkrat in na koncu gel resuspendirali v 0,5 mL pufra za razgradnjo.

Gelu smo dodali 1 mL mešanice iz 0,5 mL pripravljenega vzorca IgY in 0,5 mL pufra za razgradnjo. Pustili smo, da je inkubacija tekla preko noči pri temperaturi 37 °C in pri močnem stresanju, ki je potrebno za vzdrževanje suspenzije. Naslednji dan smo reakcijo zaustavili z dodatkom 1,5 mL 10 mM Tris-HCl s pH 7,5. Imobiliziran papain smo odstranili s centrifugiranjem. Supernatant smo shranili pri 4 °C za nadaljnjo obdelavo.



### 3.2.2 Izolacija Fc fragmentov

#### 3.2.2.1 Imunoafinitetna CNBr kromatografija

Za ločitev Fc in Fab fragmentov smo izbrali že opisano metodo (Narat, 2003) za izolacijo IgY iz različnih virov (jajčnega rumenjaka, seruma kokoši, supernatanta hibridomov). Metoda je primerna tudi za ločevanje s papainom razgrajenih Fab in Fc fragmentov IgY, če imamo ustrezna monoklonska protitelesa (mAb). Na nosilec kolone (sefaroza), ki ima aktivno skupino cianogen bromid (CNBr), smo vezali mišja mAb 3C10/F6, ki specifično vežejo lahko verigo kokošjih IgY, in torej prepoznajo epitop v Fab fragmentu IgY (Biček, 2004). Proizvedena so bila v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete.

#### Pufri za pripravo imunoafinitetne kolone

- pufer za vezavo: 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,3 + 0,5 M NaCl
- pufer za aktivacijo gela: 1 mM HCl, pH 2-3
- pufer za blokiranje ostalih aktivnih skupin sefaroze: 0,1 M Tris HCl, pH 8
- pufer za spiranje pH 4: 0,1 M acetatni pufer, pH 4 + 0,5 M NaCl
- pufer za spiranje pH 8: 0,1 M Tris HCl, pH 8 + 0,5 M NaCl

#### Priprava imunoafinitetne kolone

Za nosilec smo uporabili s CNBr aktivirano sefarozo B4<sup>®</sup> (Sigma, C-9142, ZDA), na katero smo po navodilih (Pharmacia, 71-7086-00) vezali ligand za lahke verige kokošjih IgY. Ligand so predstavljala mišja mAb 3C10/F6, ki tako prepoznavajo epitop v Fab fragmentu in ne vežejo Fc fragmenta.

Po navodilih iz 1 g suhega gela, na katerega lahko vežemo 5 mL protiteles v priporočeni koncentraciji 5-10 mg/mL, dobimo približno 3,5 mL kolone. Pripravili smo 1,7 mL mišjih mAb 3C10/F6 v pufru za vezavo s približno koncentracijo 7 mg/mL in zatehtali 0,342 g gela, ki ustreza prostornini kolone 1,2 mL (=V).

Gel smo s približno 100 mL pufru za aktivacijo gela namakali in spirali na presesalni buči približno 15 minut. Nabrekli in suh gel smo prenesli v 1,7 mL mišjih mAb 3C10/F6 in suspenzijo prenesli v kolono, ki smo jo sprali še s 6 mL (5V) pufru za vezavo. Za blokado ostalih aktivnih mest smo kolono sprali z 2,4 mL (2V) pufru za

blokiranje ostalih aktivnih skupin sefaroze. Gel smo premešali in pustili 2 uri pri sobni temperaturi v tem pufri. Sledili so trije cikli spiranja po naslednjem postopku: 6 mL (5V) pufra za spiranje pH 4,0 in 6 mL (5V) pufra za spiranje pH 8. Sledilo je spiranje s PBS, pH 8,0 (10V).

#### Uspešnost vezave 3C10/F6 na sefarozo

Z neposrednim encimskoimunskim testom smo preverili vezavo protiteles na nosilec še pred samo izvedbo kromatografije. Odvzeli smo 15  $\mu$ L pripravljenega gela. Postopek je potekal na podoben način, kot je opisan pod točko 3.3.1 s to razliko, da naj bi bila protitelesa vezana na gel namesto na membrano in da smo test opravili v epruveti. Zato je bilo potrebno po vsakem koraku centrifugirati in odstraniti supernatant. Za dokazovanje 3C10/F6 smo uporabili kozja protitelesa proti  $\gamma$  verigi mišjih IgG, konjugirana s peroksidazo (Sigma, A-3673), ki smo jih redčili s PBS pH 7,2 v razmerju 1:3000.

#### Izvedba kromatografije

Vzorec, ki smo ga nanegli na kolono, so bili s papainom razgrajeni kokošji IgY. 50  $\mu$ L vzorca smo shranili na 4 °C za kontrolo. Nanesli smo 1 mL vzorca in spirali kolono z 10V pufra PBS pH 8,0. Frakcije po 1 mL smo začeli pobirati takoj, saj se Fc fragment na kolono ne bi smel vezati. Da bi sprali iz kolone fragmente Fab ali nerazgrajene IgY, ki so se lahko na mišja mAb 3C10/F6 vezali preko lahke verige, smo nadaljevali spiranje s PBS s padajočim pH. Spiranje smo začeli s pufrom PBS pH 3,0 (3V) in nadaljevali z PBS pH 2,5 (3V). Zbranim frakcijam smo dodali razredčen NaOH, da smo ponovno zvišali pH na nevtralno vrednost. Spektrofotometer smo umerili s PBS pH 8,0 in pri vseh frakcijah izmerili absorbanco pri 280 nm. Frakciji 13 in 17 sta imeli najvišjo izmerjeno absorbanco, zato smo ju nadalje preverili z encimskoimunskim testom (točka 3.3.1) za vsebnost lahkih in težkih verig.

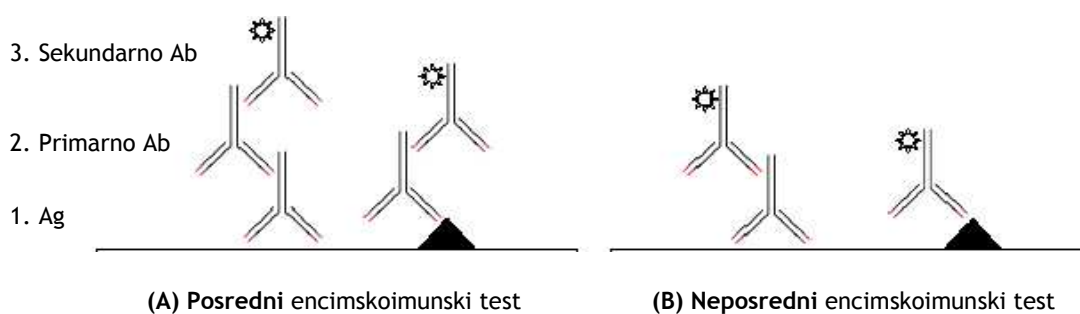
### 3.2.2.2 HPLC kromatografija

Rezultati encimskoimunskega testa so pokazali, da v frakcijah, pridobljenih z imunoafinitetno CNBr kromatografijo, nismo uspeli pridobiti posameznih fragmentov IgY (točka 3.3.1). Zato smo se odločili, da izvedemo še tekočinsko kromatografijo z visoko ločljivostjo (HPLC) z dietil aminoetil (DEAE) sefarozo, po podobnem postopku kot Suzuki in Lee (2004). Z izvedbo kromatografije so nam prijazno pomagali v BIA Separations d.o.o.

DEAE disk omogoča hiter potek kromatografije. Nanešeni vzorec razgrajenih kokošjih IgY (s koncentracijo 6 mg/mL) je bil 200  $\mu$ L. Za spiranje smo uporabili pufer A (50 mM Tris, pH 8,5) in pufer B (50 mM Tris + 1 M NaCl, pH 8,5). Pretok je bil 3 mL/min, trajanje kromatografije pa 5 minut. V prvi minuti je spiranje potekalo s pufrom A, v drugi in tretji minuti z naraščajočim linearnim gradientom NaCl kot posledica mešanja obeh pufrov (0-40 % pufra B), v četrti minuti s 40 % pufrom B in v peti minuti ponovno s pufrom A. Hkrati je potekalo merjenje absorbance pri 280 nm.

### 3.3 USPEŠNOST PRIPRAVE Fc FRAGMENTOV KOKOŠJIH IgY

Po obeh kromatografijah smo z encimskoimunskim testom DIBA (Benčina in sod., 2005) preverili tiste frakcije, ki so pri merjenju absorbance pokazale večjo vsebnost proteinov. Ime testa izhaja iz načina izvedbe, saj antigen naneseemo na membrano s pipeto v obliki pike (dot immunobinding assay).



**Slika 5:** Shema posrednega (A) in neposrednega (B) encimskoimunskega testa. Na sliki A je na nitrocelulozno membrano vezan antigen (Ag) – katerakoli proteinska molekula (črn trikotnik) ali protitelo (Ab). Antigen specifično prepozna primarno Ab, na katerega se veže sekundarno Ab, ki je konjugirano z encimom peroksidaza. Po dodatku kromogenega substrata (TrueBlue) poteče reakcija in razvije se modra barva. Na sliki B Ag neposredno veže konjugirano protitelo.

### 3.3.1 DIBA po imunoafinitetni CNBr kromatografiji

S posrednim encimskoimunskim testom smo frakciji 13 in 17 ter vzorec razgrajenih IgY, ki ga nismo nanegli na kolono (kontrola) testirali na prisotnost Fc fragmenta in čistost frakcij.

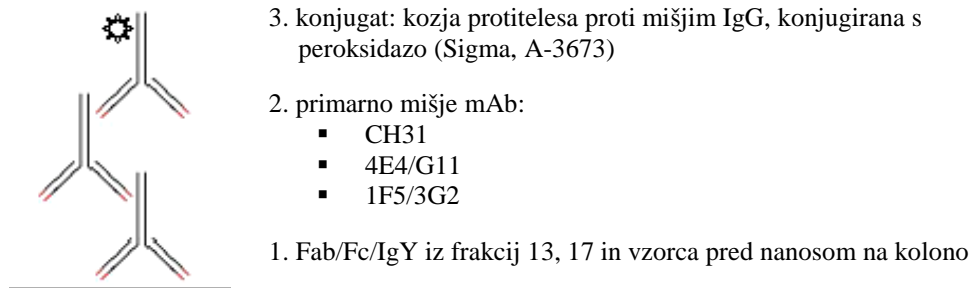
Uporabili smo tri trakove nitrocelulozne membrane (NC-extra, Sartorius); označene 1, 2, 3, ki so vsebovale tri kvadratke s površino 0,25 mm<sup>2</sup>. Membrane smo najprej 20 minut namakali v destilirani vodi. Na vsakem traku smo na osušene kvadratke nanegli po 2 µL vzorca razgrajenega IgY, ki smo ga shranili pred nanosom na kolono, ter frakciji 13 in 17. Ko so se vzorci dobro vpili, smo membrane 40 minut inkubirali v 0,5 % TPBS, da smo blokirali nezapolnjena mesta. Nato smo posamezne trakove 45 minut ločeno inkubirali v treh različnih primarnih mišjih mAb proti kokošjim IgY, redčenih s PBS pH 7,2 (preglednica 4).

**Preglednica 4:** Primarna mišja monoklonska protitelesa proti kokošjim IgY, ki smo jih uporabili pri testu DIBA

Oznaka mAb	Specifičnost mAb	Redčitev
CH31	lahka veriga kokošjih Ig (Sigma, C-7910)	1:1000
4E4/G11*	lahka in težka veriga kokošjih IgY (Biček, 2004)	1:10
1F5/3G2*	težka veriga kokošjih IgY; verjetno Fc del (Rejc, 1999)	1:10

Opomba: \* mAb so bila proizvedena v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete

Nato smo spirali membrano trikrat po 10 minut v 0,05 % TPBS. Sledila je inkubacija s sekundarnimi protitelesi; s kozjimi protitelesi proti mišjim IgG, konjugiranimi s peroksidazo (Sigma, A-3673), ki smo jih redčili 1:10000 s PBS pH 7,2. Ponovno smo dvakrat po 10 minut spirali z 0,05 % TPBS in enkrat po 10 minut s PBS pH 7,2. Po dodatku substrata TrueBlue<sup>TM</sup> (Kirkegaard & Perry Laboratories, ZDA) smo počakali ali se bo razvila modra barva in ustavili reakcijo s prenosom v destilirano vodo. Glede na intenziteto in prisotnost obarvanja, smo reakcijo označili kot zelo močno +++, močno ++, manj močno +, šibko (+) ali negativno -.

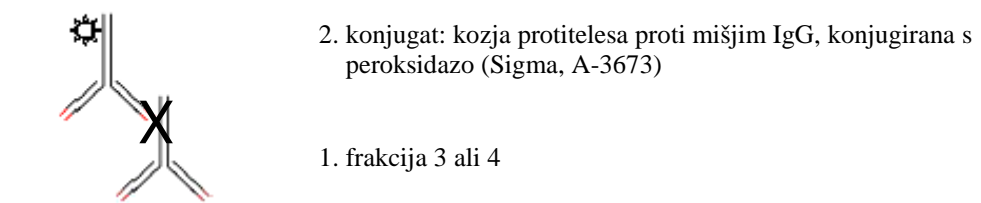


**Slika 6:** Shema posrednega encimskoimunskega testa (DIBA) za preverjanje prisotnosti težkih in lahkih verig v frakcijah 13 in 17 po imunoafinitetni CNBr kromatografiji.

### 3.3.2 DIBA po HPLC kromatografiji

S posrednim encimskoimunskim testom smo na enak način kot pri točki 3.3.1 preverili prisotnost lahkih in težkih verig IgY v frakcijah 3 in 4. Na nitrocelulozno membrano smo nanесли po 2  $\mu$ L nerazredčenih in v PBS pH 7,2 redčenih (1:10, 1:20, 1:40) frakcij 3 in 4. Ostalo je potekalo po enakem postopku, kot je opisano pri točki 3.3.1.

Dodatno smo z neposrednim encimskoimunskim testom naredili kontrolo specifične vezave konjugata A-3673 (Sigma) na proteine v frakcijah 3 in 4, kot prikazuje slika 7. Nitrocelulozno membrano z nanesenima redčenima in neredčenima frakcijama 3 in 4 smo takoj inkubirali v konjugatu (redčenem s PBS, pH 7,2 1:10000) in nato nadaljevali, kot je opisano pod točko 3.3.1.



**Slika 7:** Neposredni encimskoimunski test za kontrolo specifične vezave konjugata. Križec nakazuje, da mora biti reakcija negativna.

### 3.4 IDENTIFIKACIJA RECEPTORJA ZA Fc DEL IgY (FcR)

Za identifikacijo FcR smo izvedli test po principu posrednega encimskoimunskega testa, kot je opisano pri točki 3.3.1. V tem primeru so antigene predstavljali z NaDS-PAGE ločeni in na PVDF membrano preneseni proteini *M. synoviae* (točka 3.1.3). Razlika je tudi v tem, da med možnim FcR in Fc fragmentom kokošnjih IgY nismo iskali prave imunske reakcije, saj gre za nespecifično vezavo.

V preglednici 5 so prikazani izvedeni encimskoimunski testi. Trakove membran smo inkubirali v redčenih kokošnjih serumih ali Fc fragmentu. Uporabili smo dva različna normalna seruma kokoši, ki niso bile načrtno okužene z *M. synoviae*. Ker sami nismo uspešno pridobili Fc fragmentov, smo uporabili komercialni Fc fragment (Jackson Immuno Research, 003-000-008). Hkrati smo izvajali negativno kontrolo, pri čemer je postopek potekal enako kot pri inkubaciji s serumom/Fc fragmentom, le da smo namesto tega membrano inkubirali v PBS, pH 7,2. Po 45 minutni inkubaciji je sledilo spiranje z 0,05 % TPBS in inkubacija v konjugatu – s peroksidazo konjugiranimi protitelesi proti kokošnjim IgY. Po nanosu substrata TrueBlue smo po prvem opaznem obarvanju prekinili nadaljnji razvoj barvne reakcije s prestavitvijo trakov v destilirano vodo.

**Preglednica 5:** Shema encimskoimunskih testov za identifikacijo FcR pri *M. synoviae* ULB01B/P4. Membrano z ločenimi proteini *M. synoviae* smo inkubirali v kokošnjem serumu, Fc fragmentu ali PBS (negativna kontrola). Sledila je inkubacija v protitelesih proti kokošnjim IgY, konjugiranimi s peroksidazo in nato nanos kromogenega substrata TrueBlue.

Št. el. <sup>1</sup>	Inkubacija z/s	Redčitev <sup>4</sup>	Konjugat	Redčitev
<b>I.</b>	kokošnjim normalnim serumom <sup>2</sup>	1:50	Kunčja protitelesa proti kokošnjim IgY, konjugirana s peroksidazo (A-9046, Sigma)	1:10000
	PBS, pH 7,2	-		
<b>II.</b>	Fc fragmentom (komercialnim) <sup>3</sup>	1:115	Kunčja protitelesa proti Fc delu kokošnjih IgY, konjugirana s peroksidazo (Jackson Immuno Research, 303-035-008)	1:10000
	kokošnjim normalnim serumom	1:50		
	PBS, pH 7,2	-		

- Opombe:
- 1) Številki I in II se nanašata na dve različni elektroforezi, iz katerih izhajajo membranski trakovi z ločenimi proteini *M. synoviae*. Izvedeni sta bili z istim vzorcem, a s časovnim presledkom.
  - 2) Uporabili smo seruma dveh kokoši, ki nista bili načrtno okuženi z *M. synoviae*.
  - 3) Fc fragment (komercialni), Jackson Immuno Research, 003-000-008
  - 4) Za vse redčitve smo uporabili PBS; pH 7,2

## 4 REZULTATI

### 4.1 USPEŠNOST PRIPRAVE Fc FRAGMENTOV KOKOŠJIH IgY

Po razgradnji s papainom smo prešli na ločitev posameznih fragmentov kokošjih IgY in izvedli imunoafinitetno CNBr in HPLC kromatografijo. Posamezne frakcije, ki smo jih pridobili z obema kromatografijama, smo testirali na vsebnost lahkih in težkih verig z encimskoimunskim testom DIBA.

#### 4.1.1 Testiranje frakcij na prisotnost protiteles po CNBr kromatografiji










Encimskoimunski test smo izvedli samo za frakciji 13 in 17, ker sta imeli največjo vrednost absorbance, izmerjene pri 280 nm. Predvidevali smo, da bodo v frakciji 13 Fc fragmenti, ki se na kolono naj ne bi vezali in bi se morali sprati skupaj s PBS, pH 8,0. V frakciji 17 naj bi bile prisotne le lahke verige in morda celotne IgY molekule, ki so se vezale v koloni na mišja mAb 3C10/F6 proti lahkim verigam kokošjih IgY (rezultat neposrednega encimskoimunskega testa v epruveti (točka 3.2.2.1), katerega namen je bil preveriti uspešnost vezave 3C10/F6 na sefarozo, je bil pozitiven) in se nato sprali zaradi znižanja pH PBS. Test DIBA je bil zato zasnovan tako, da bi s pomočjo mišjih mAb, ki specifično prepoznavajo lahke ali težke verige kokošjih IgY ugotovili prisotnost Fc fragmentov in lahkih verig v testiranih frakcijah. Iz preglednice 6 so razvidne pričakovane reakcije med testiranimi vzorci in primarnimi mišjimi mAb.

**Preglednica 6:** Zasnova testa DIBA s pričakovanimi rezultati.

Št. traku	Testirani vzorci			Mišja mAb proti kokošjim IgY	
	frakcija 17	frakcija 13	K*	Oznaka	Specifičnost
1	+	-	+	CH31	lahka veriga
2	+	-	+	4E4/G11	lahka in težka veriga
3	-	+	+	1F5/3G2	težka veriga (verjetno Fc del)

Opombe: \* kontrola: vzorec kokošjih IgY po razgradnji s papainom, ki ga nismo nanесли na kolono

+ pomeni pozitivno reakcijo, - odsotnost reakcije

Testirani vzorci			Testirani vzorci			Mišja mAb proti kokošjim IgY	
fr. 17	fr. 13	K	fr. 17	fr. 13	K	Oznaka	Specifičnost
			+++	(+)	+	CH31	lahka veriga
			+++	(+)	+	4E4/G11	lahka in težka veriga
			+++	(+)	+	1F5/3G2	težka veriga (Fc del)

**Slika 8:** Rezultati testa DIBA za frakciji 13 in 17, pridobljenih s CNBr kromatografijo. Frakciji 13, 17 ter kontrolo (K – vzorec s papainom razgrajenih kokošjih IgY, ki ga nismo nanegli na CNBr kolono) smo inkubirali v treh različnih mišjih mAb, ki specifično prepoznavajo lahke ali težke verige kokošjih IgY. Po inkubaciji v konjugatu in dodatku substrata TrueBlue smo glede na intenziteto in prisotnost obarvanja reakcijo opredelili kot: zelo močno +++, močno ++, manj močno +, šibko (+) ali negativno -.

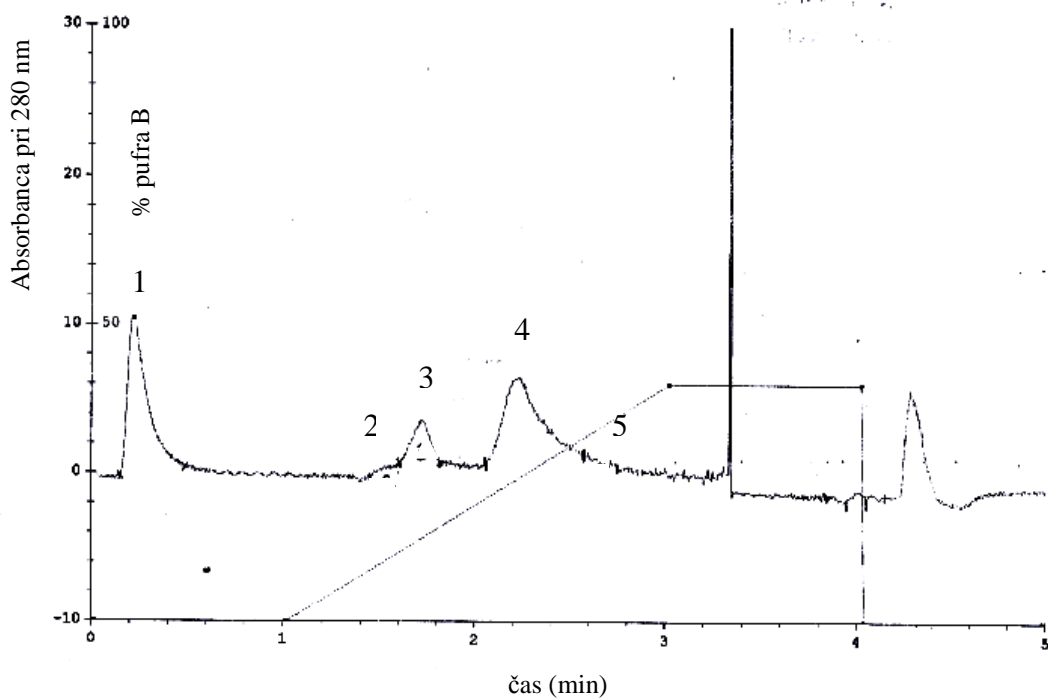
Iz slike 8 je razvidno, da smo pri vseh treh testiranih vzorcih dobili pozitiven rezultat. To smo seveda pričakovali le pri kontroli; vzorcu kokošjih IgY, ki smo jih razgradili s papainom, a ga nismo nanegli na imunoafinitetno kromatografijo in je še vedno vseboval Fc, Fab fragmente ali celotno IgY. Takšen rezultat pomeni, da frakcije 13 ni bilo mogoče uporabiti v nadaljevanju, saj ni vsebovala čistega Fc fragmenta. Če bi bilo tako, bi bila reakcija pozitivna le z mišjimi mAb 1F5/3G2, vendar je bil rezultat pozitiven tudi s CH31, ki se veže na lahko verigo kokošjih imunoglobulinov. Poleg tega frakcija 17 vsebuje več imunoglobulinov ali njihovih delov, saj so reakcije mnogo bolj intenzivne kot pri frakciji 13.

#### 4.1.2 Izolacija Fc fragmentov s HPLC kromatografijo

Zaradi slabih rezultatov pri ločevanju fragmentov kokošjih IgY z imunoafinitetno CNBr kromatografijo, smo se odločili IgY, ki smo jih razgradili s papainom, ločiti še na drug način. Prijazno so nam pomagali v BIA Separations d.o.o., kjer so izvedli HPLC kromatografijo z DEAE diskom.

Elucijski profil s papainom razgrajenih IgY smo primerjali z rezultati podobne kromatografije, ki sta jo izvedla Suzuki in Lee (2004). Pri merjenju absorbance (280 nm) sta dobila tri vrhove z večjo vsebnostjo proteinov. Pri njiju se je izkazalo, da so v prvem vrhu Fab fragmenti, v drugem mešanica Fab in Fc fragmentov ter v tretjem vrhu samo Fc fragmenti IgY.





**Slika 9:** Elucijski profil po HPLC kromatografiji. Kromatografija je potekala 5 minut. Od 1-5 so označeni posamezni vrhovi. Spiranje je potekalo z naraščajočim linearnim gradientom NaCl, ki je nastal kot posledica mešanja pufra A (50 mM Tris, pH 8,5) in pufra B (50 mM Tris + 1 M NaCl, pH 8,5) kot prikazuje linearna črta :

- v 1. minuti: 100 % pufra A,
- v 2. in 3. minuti: 0-40 % pufra B,
- v 4. minuti: 40 % pufra B,
- v 5. minuti: 100 % pufra A.

Na našem elucijskem profilu smo označili pet vrhov, izmed njih so vrhovi 1, 3 in 4 najizrazitejši po vsebnosti proteinov. Sklepali smo, da je vrh 1 vseboval Fab fragment, medtem ko bi v vrhu 3 in 4 lahko bil Fc fragment (Suzuki in Lee, 2004).

Zato smo s testom DIBA testirali frakciji 3 in 4, podobno kot je opisano pod točko 3.3.1.

#### 4.1.2.1 Testiranje frakcij na prisotnost protiteles po HPLC kromatografiji

V preglednici 7 so predstavljeni rezultati encimskoimunskega testa DIBA za frakciji 3 in 4, v katerih bi se naj po uspešni ločitvi pojavili Fc fragmenti. Edini pozitiven rezultat, a spet z vsemi mišjimi mAb, smo dobili pri frakciji 4, kjer smo pričakovali pozitivno reakcijo samo z 1F5/3G2.

**Preglednica 7:** Rezultat testa DIBA za frakciji 3 in 4 po HPLC kromatografiji s papainom razgrajenih kokošjih IgY.

Redčitev frakcij s PBS		Konc.	1:10	1:20	1:40	
Mišja mAb proti kokošjim IgY						
Oznaka	Specifičnost					
CH31	lahka veriga	-	-	-	-	Frakcija 3
4E4/G11	lahka in težka veriga	-	-	-	-	
1F5/3G3	težka veriga (Fc del)	-	-	-	-	
CH31	lahka veriga	+	-	-	-	Frakcija 4
4E4/G11	lahka in težka veriga	+	-	-	-	
1F5/3G3	težka veriga (Fc del)	+	-	-	-	

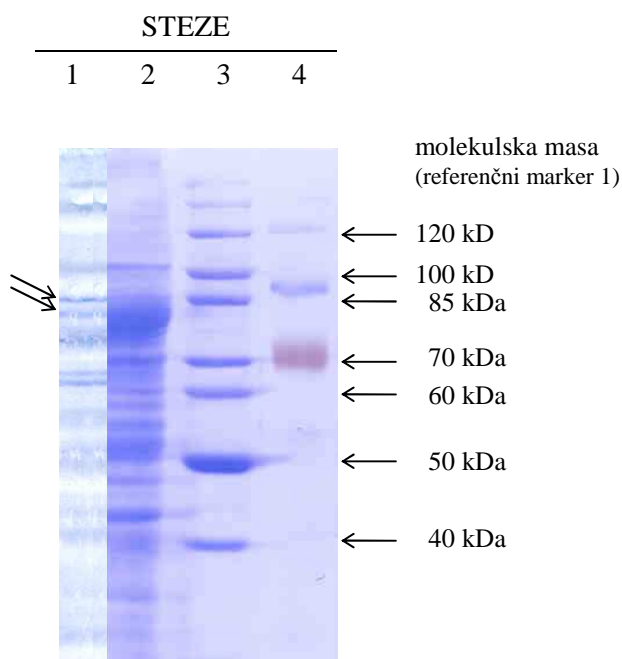
Opombe: + = pozitivna reakcija  
 - = negativna reakcija

Za detektiranje vezanih mAb smo uporabili konjugat A-3673, Sigma (kozja protitelesa proti mišjim IgG, konjugirana s peroksidazo). Z neposrednim encimskoimunskim testom smo predhodno preverili, da se ta konjugat ne veže z IgY.

Konjugat (Sigma, A-3673), ki smo ga uporabili pri encimskoimunskem testu, se ne veže neposredno in nespecifično na kokošje IgY, tako da to ni razlog za vse pozitivne reakcije, ki smo jih zaznali pri frakciji 4.

#### 4.2 IDENTIFIKACIJA Fc RECEPTORJA V PROTEINSKEM PROFILU *M. synoviae*

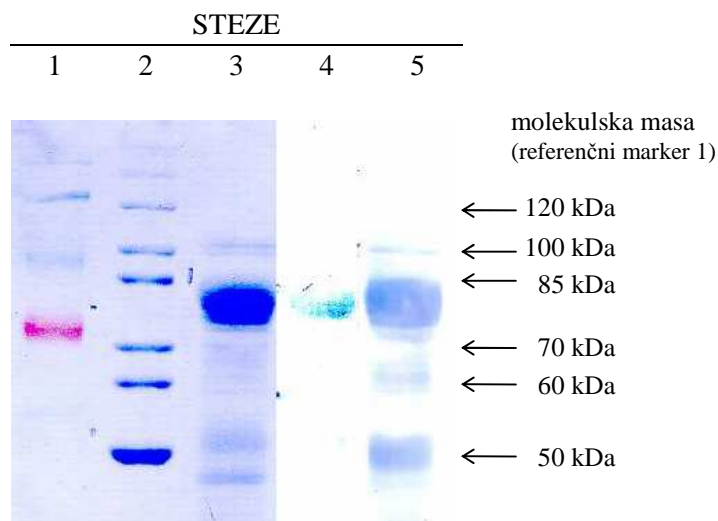
Na sliki 10 lahko vidimo profil proteinov *M. synoviae* ULB01B/P4, ki smo ga dobili po ločitvi proteinov z NaDS-PAGE in prenosu na membrano. Trak smo inkubirali v kokošnjem serumu.



**Slika 10:** Profil proteinov *M. synoviae* (ULB01B/P4) na membrani po elektroforezi in identifikacija receptorjev za Fc del IgY s pomočjo kokošjega normalnega seruma. Na gel so bili nanešeni: stezi 1 in 2: lizat celic *M. synoviae*; steza 3: referenčni marker 1 (PageRuler™ Protein Ladder, Fermentas, SM0661); steza 4: referenčni marker 2 (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, SM0671); molekulske mase si sledijo od rdečega pasu navzgor: 72 kDa, 100 kDa in 130 kDa). Membrana s stezami 2-4 je bila barvana z barvilom Coomassie briliant blue R250. Membrano s stezo 1 smo inkubirali v kokošnjem serumu, redčenem s PBS pH 7,2 v razmerju 1:50 in nato v konjugatu (kunčja protitelesa proti kokošnjim IgY, konjugirana s peroksidazo; A-9046, Sigma). Na koncu smo dodali kromogeni substrat TrueBlue. Na levi strani sta s puščicama označena proteina, ki sta reagirala z IgY iz kokošjega seruma in bi lahko glede na molekulsko maso predstavljala Fc receptorja.

Pri inkubaciji s kokošnjim serumom se je obarvalo več pasov. Na sliki 10 sta s puščico označena le dva proteina *M. synoviae*. Glede na pozitivno reakcijo s kokošnjimi IgY in molekulski masi obeh proteinov, ki ustrežata približno 85 kDa in 90 kDa smo sklepali, da bi to lahko bila predhodno opisana Fc receptorja. Vendarle ni povsem jasno, ali gre za vezavo med tema dvema proteinoma preko Fc ali Fab dela kokošjih IgY.

Trak membrane, ki smo ga inkubirali v PBS namesto v protitelesih, sicer pa v nadaljevanju izvedli enak encimskoimunski test, kot je opisano pod sliko 10, se ni obarval. Torej se konjugat (kunjča protitelesa proti kokošnjim IgY, konjugirana s peroksidazo; A-9046, Sigma) niso vezala neposredno na proteine *M. synoviae*.



**Slika 11:** Profil proteinov *M. synoviae* (ULB 01B/P4) na membrani po elektroforezi in identifikacija receptorjev za Fc del IgY s pomočjo Fc fragmenta. Vzorci, ločeni z NaDS-PAGE: steza 1: referenčni marker 2 (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, SM0671; približne molekulske mase si sledijo od rdečega pasu navzgor: 72 kDa, 100 kDa in 130 kDa); steza 2: referenčni marker 1 (PageRuler™ Protein Ladder, Fermentas, SM0661); steze 3-5: lizat celic *M. synoviae*. Membrana s stezami 1-3 je bila barvana z barvilom Coomassie brilliant blue R250. Membrano s stezo 4 smo inkubirali v kokošnjem Fc fragmentu (Jackson Immuno Research, 003-000-008, redčenem s PBS pH 7,2 1:115) in membrano s stezo 5 v kokošnjem serumu, redčenem s PBS pH 7,2 v razmerju 1:50. Nato smo membrani s stezama 4 in 5 inkubirali v konjugatu (kunjča protitelesa proti Fc delu kokošnjih IgY, konjugirana s peroksidazo; Jackson Immuno research, 303-035-008) in dodali kromogeni substrat TrueBlue. Konjugat se ni vezal neposredno na proteine *M. synoviae*.

Iz prejšnjih rezultatov je razvidno, da nismo uspeli pridobiti (čistega) Fc fragmenta, ki bi ga lahko uporabili za identifikacijo, zato smo uporabili komercialnega (Jackson Immuno Research, 003-000-008).

Na sliki 11 je na stezi 4 viden nekoliko širši pas, ki je reagiral z Fc fragmentom. Posledično bi se iz te reakcije dalo sklepati, da gre za Fc receptor. Morda gre celo za dva proteina z molekulsko maso okoli 80 kDa (82-85 kDa). Lauerman in sod. (1993) poročajo, da lahko pri daljšem hranjenju pripravka *M. synoviae* pride do izgube enega ali obeh receptorjev.

Kokošji serum je reagiral z več proteini, in sicer je viden pas z velikostjo 100 kDa, glede intenzivnosti reakcije izstopata širša pasova okrog 80 kDa in 50 kDa.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Vse vrste v živalskem kraljestvu so razvile obrambne sisteme za zaščito pred vdorom tujih snovi in patogenih mikrobov in v splošnem je imunski sistem pri pticah enak imunskemu sistemu sesalcev. Proti imunogenim proteinom patogenih mikroorganizmov tako ptice kot sesalci tvorijo protitelesa. Glavni serumski protitelesi sta IgG pri sesalcih in njegov homolog IgY pri pticah (Warr in sod., 1995; Carlander, 2002).

*Mycoplasma synoviae* je patogena bakterija, ki pri kokoših in puranih pogosto povzroča kronične okužbe. Predvidevajo, da bi to lahko bilo povezano s spremenljivostjo glavnih imunogenih površinskih proteinov, kot sta MSPA in MSPB, kar naj bi omogočalo izogibanje humoralnemu imunskemu odzivu in posledično vztrajanje bakterije v gostitelju. Vloga FcR, ki so bili dokazani tudi pri drugih vrstah mikoplazem, pri sami patogenezi ni razjasnjena (Lauerman in sod., 1993; Lockaby in sod., 1998; Kleven, 2003).

Tudi številne druge bakterije imajo na svoji površini proteine, ki neimunsko vežejo protitelesa preko Fc dela. V glavnem gre za proteine, ki imajo sposobnost vezave sesalčjih IgG. Eden najbolj znanih je protein A pri bakteriji *Staphylococcus aureus*, ki je široko uporabljen v encimskoimunskih testih in za izolacijo sesalčjih IgG kot ligand pri afinitetni kromatografiji.

Podobno kot zgoraj omenjeni bakterijski FcR, ki vežejo sesalčje IgG, bi lahko bili tudi mikoplazemski FcR, ki vežejo IgY, uporabni za njihovo detekcijo in izolacijo. Oba predhodno odkrita FcR pri *M. synoviae* sta močno reagirala z Fc delom kokošjih IgY. Čeprav so bili številni imunski testi zasnovani za IgG, pa so ravno tako ali še boljše uporabni za IgY. Z njihovo uporabo se je namreč možno izogniti lažno pozitivnim/negativnim rezultatom, kot se to dogaja pri uporabi IgG, za kar je veliko vzrokov v različnih lastnostih Fc delov (Lauerman in Reynolds-Vaughn, 1991; Tini in sod., 2002; Narat, 2003).

Za identifikacijo FcR pri *M. synoviae* smo izbrali kokošje IgY, ki se močno vežejo z FcR preko Fc dela. Da bi izločili morebitne specifične oziroma imunske reakcije, ki jih posreduje Fab del protiteles, smo morali uporabiti samo Fc del IgY. To smo želeli doseči z razgradnjo kokošjih IgY s papainom. Ta encim cepi na pregibu protitelesne molekule tako, da nastaneta dva Fab fragmenta in Fc fragment. Kot druge možnosti za dokaz nespecifične vezave bi lahko uporabili tudi neimunski serum kokoši, ki ni bila nikoli v stiku s *M. synoviae* ali celo kokošja monoklonska protitelesa, ki so specifična samo za en antigen, ki ne pripada *M. synoviae*.

Po delovanju papaina smo produkte nanесли na CNBr sefarozo, v katero smo kot ligand uspešno vezali mišja mAb proti lahki verigi kokošjih IgY (3C10/1F6). Merjenje absorbance pri 280 nm je pokazalo najvišjo vsebnost proteinov v frakcijah 13 in 17. V frakciji 13 smo pričakovali samo Fc fragmente, ki se ne vežejo na 3C10/1F6 in se sperejo iz kolone. V frakciji 17, ki smo jo dobili po spiranju s pufrom PBS pH 2,5, smo pričakovali Fab fragmente.

Rezultati encimskoimunskega testa DIBA pa so pokazali drugače (slika 8). Obe frakciji (posebno močno frakcija 17 in zelo slabo frakcija 13) sta z vsemi tremi uporabljenimi mišjimi mAb proti posameznim verigam kokošjih IgY (CH31, ki veže lahke verige; 4E4/G11, ki veže lahke in težke verige; 1F5/3G2, ki veže težke verige; verjetno Fc del) pozitivno reagirali. Iz teh rezultatov je razvidno, da nismo pridobili čistega Fc fragmenta, ki bi ga lahko uporabili. Najverjetnejša je razlaga, da se IgY niso uspešno razgradili in da so bili kot produkti poleg Fab in Fc fragmentov predvsem prisotne še cele molekule IgY. Neuspešno razgradnjo podpira tudi dejstvo, da se vzorec med razgradnjo zaradi tehničnih težav ni ves čas mešal, kar je pomembno za vzdrževanje suspenzije uporabljenega – na agarozo vezanega – papaina.

Vseeno smo še enkrat, a spet neuspešno, poskusili izolirati čisti Fc fragment; tokrat s HPLC kromatografijo, ki so nam jo pomagali izvesti v BIA Separations d.o.o. Morali bi izvesti NaDS-PAGE, da bi ugotovili uspešnost cepitve s papainom. V nadaljevanju smo tako uporabili komercialni Fc fragment.

Lizat celic *M. synoviae* ULB01B/P4 smo do uporabe shranili na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Uporabili smo ga za izvedbo NaDS-PAGE za ločitev proteinov, ki smo jih nato prenesli na membrano. Na slikah 10 in 11 lahko vidimo profil ločenih proteinov po NaDS-PAGE in prenosu na membrano, ki smo jih obarvali s Coomassie brilliant blue. Kaže, da so v območju molekulskih mas, kjer pričakujemo FcR, močno izraženi nekateri proteini. Berčič in sod. (2007) so pri izolatu, ki je soroden našemu, določili N-terminalna aminokislinska zaporedja nekaterih proteinov z molekulskimi masami od 78 kDa do 90 kDa. Tako so identificirali proteina z molekulskima masama približno 78 kDa, ki sta lipoprotein (LP78) in PdhD (dihidrolipoamid dehidrogenaza). Molekulsko maso okoli 82 kDa imata elongacijski faktor EF-G in protein, ki je verjetno lipoprotein, proteina z velikostjo okoli 85 kDa sta verjetno lipoprotein (LP85) in protein PtsG. Proteina z molekulsko maso okoli 90 kDa niso uspeli identificirati. Iz tega je razvidno, da je lahko posamezen pas proteinov na membrani vseboval več različnih proteinov, ki komigrirajo v gelu pod vplivom električnega toka.

Reakcija med proteini *M. synoviae* ULB01B/P4 ter kokošjimi IgY je prikazana na sliki 10. Uporabili smo serum kokoši, ki ni bila načrtno okužena z *M. synoviae* in zato naj ne bi vseboval specifičnih protiteles. Lepo sta vidna ozka pasova proteinov z molekulskima masama, katerih vrednosti lahko ocenimo na okoli 80/85 kDa in 90 kDa, ki sta reagirala z IgY. Na podlagi molekulskih mas lahko sklepamo, da sta FcR. Podobne rezultate so pri sorodnem sevu (ULB02/P4) dobili v raziskavi tudi Berčič in sod. (2007), saj sta kokošje IgY pri njih vezala proteina s približno velikostjo 85 kDa in 90 kDa. Domnevali so, da bi bilo N-terminalno aminokislinsko zaporedje možno določiti, če bi te proteine najprej izolirali z afinitetno kromatografijo z IgY kot ligandom. S strani Lauermana in sod. po letu 1993 nadaljnje proučevanje FcR, kot je npr. določanje aminokislinskega zaporedja, ni več potekalo (Lauerman, 2005).

ULB01B/P4 in ULB02/P4 sta sorodna seva, medtem ko so Lauerman in sod. (1993) dokazali, da lahko med različnimi sevi prihaja do variacij v velikosti FcR, in sicer so njihovi rezultati pokazali, da je molekulska masa nihala od 78,4-83,6 kDa ter 89,0-93,0 kDa. Opazna razlika je bila npr. med molekulskima masama FcR pri sevih F10-2AS in WVU 1853, ki se nahajata okoli 80 kDa. V predhodni raziskavi sta Lauerman in



Reynolds-Vaughn (1991) prvič okarakterizirala FcR pri *M. synoviae*, in sicer pri sevu F10-2AS. Za FcR s približno velikostjo 80 kDa sta določila izoelektrično točko (pI) 5,3 in za protein s približno velikostjo 90 kDa pI 4,3. Vendar po drugi strani v sekvenciranem genomu *M. synoviae* 53 (Vasconcelos in sod., 2005) ni gena, ki bi kodiral protein z molekulsko maso približno 90 kDa in hkrati tako nizko pI, kar se lahko predvidi iz genskega zaporedja z obstoječimi orodji na internetu (<http://www.expasy.org/tools/>).

Primer proteina, ki ima različno molekulsko maso pri različnih sevih je tudi MSPB (Avakian in Kleven, 1992; Benčina in sod., 2001). Za sev ULB01B/P4 je iz prejšnjih raziskav razvidno, da ima protein MSPB nekoliko manjšo molekulsko maso (približno 40 kDa) kot tipski sev WVU 1853 (približno 45 kDa) (Benčina in sod., 2005; Berčič in sod., 2007; Lavrič in sod., 2007). To je posledica delecije sedeminpetdesetih nukleotidov na 5' koncu zaporedja gena *vlhA*, kjer se nahajajo s prolinom bogate ponovitve, in je razlog za variacijo velikosti tega proteina pri različnih sevih (Benčina in sod., 2001).

Prej omenjena proteina izolata ULB02/P4 s približno molekulsko maso 85 kDa in 90 kDa sta reagirala tudi s kozjimi IgG (Berčič in sod., 2007). Tudi iz raziskave Lauermana in Reynolds-Vaughna (1991) je razvidno, da sta FcR šibko reagirala tudi z IgG kunca ali koze (preglednica 2). Kunčja protitelesa proti kokošjim IgY, ki so bila konjugirana s peroksidazo in smo jih v posrednem encimskoimunskem testu (slika 10, 11) uporabili za detekcijo IgY, vezanih na proteine *M. synoviae* ULB01B/P4, se na mikoplazemske proteine niso vezala neposredno. Torej reakcije, ki so vidne na slikah 10 in 11, niso posledica neposredne vezave konjugata na proteine *M. synoviae* ULB01B/P4.

Znano je tudi, da lahko nekatere vrste mikoplazem vežejo tudi prašičje IgG iz gojišča, kar je v encimskoimunskih testih vidno kot reakcija kolonij s konjugatom, ki detektira prašičje IgG (Benčina, 2002). To sposobnost imajo očitno tudi sevi, sorodni ULB01B/P4, saj so Berčič in sod. (2007) ugotovili, da je med proteini v profilu *M. synoviae* (na mestih 52 kDa in 85 kDa) prisotna tudi težka veriga svinjskega IgG, ki

izhaja iz seruma v gojišču. Po drugi strani Lauerman in Reynolds-Vaughn (1991) poročata, da se prašičji IgG ne vežejo z FcR.

Za identifikacijo FcR (glede molekulske mase) smo uporabili komercialni Fc fragment, zaradi česar je možno izločiti imunske reakcije s FcR, ki bi jih lahko posredoval Fab del kokošnjih IgY. Rezultat reakcije med Fc fragmentom in mikoplazemskimi proteini (slika 11) je na membrani viden bodisi kot nekoliko širši pas s približno molekulsko maso 82-85 kDa bodisi bi lahko šlo celo za dva proteina. Za *M. synoviae* je značilno spremenljivo izražanje proteinov (Benčina, 2002; Berčič in sod., 2007) in morda velja to tudi za FcR. Kaže, da je eden od obeh FcR v raziskavi Lauermana in sod. (1993) šibkeje izražen kot drugi. Po drugi strani so Lauerman in sod. (1993) poročali, da lahko pride do izgube FcR med hranjenjem pripravka *M. synoviae*.

Poleg tega, da smo eno membrano z ločenimi proteini *M. synoviae* ULB01B/P4 inkubirali z Fc fragmentom, smo drugi trak membrane inkubirali tudi v kokošnjem normalnem serumu (slika 11). Nismo uporabili isti serum kot predhodno (slika 10), vendar tudi za tega velja, da kokoš ni bila načrtno okužena z *M. synoviae*. IgY iz tega seruma so reagirala s proteinom z velikostjo okoli 100 kDa, po intenzivnosti reakcije izstopata tudi pasova okoli 50 kDa in 80 kDa.

Možno je, da so to imunogeni proteini *M. synoviae*, ki so reagirali s specifičnimi IgY iz seruma kot posledica velike razširjenosti okužbe z *M. synoviae*. Kot imunogena proteina sta pri *M. synoviae* najbolj poznana MSPB in MSPA (Noormohammadi in sod., 1997). MSPB je pri ULB01B/P4 velik okoli 40 kDa (Benčina in sod., 2005; Berčič in sod., 2007; Lavrič in sod., 2007) in MSPA okoli 50 kDa (Berčič in sod., 2007).

Možne so tudi navzkrižne reakcije med specifičnimi serumskimi IgY proti npr. *M. gallisepticum*. Že Bradley in sod. (1988) so poročali, da zlasti proteina *M. synoviae* z molekulsko maso 53 kDa in 88 kDa reagirata s protitelesi proti *M. gallisepticum*. Pri tem protein s 53 kDa ni MSPA, kajti pri testu HI ni prihajalo do tovrstnih navzkrižnih reakcij. Tudi Berčič in sod. (2007) so ugotovili, da nekateri proteini *M. synoviae* (z molekulskimi masami 70, 75, 82, 90 in 110 kDa) reagirajo tudi s kunčjimi protitelesi

proti *M. gallisepticum*. Vendar, če vežejo FcR tudi kunčje IgG (Lauerman in Reynolds-Vaughn, 1991), je morda lahko kateri od teh proteinov (82, 90 kDa) tudi FcR.

## 5.2 SKLEPI

- Pri *M. synoviae* se FcR nahajajo med molekulskimi masami nekje od 80-90 kDa. Izolat ULB01B/P4 ima več močno izraženih proteinov ravno v tem obsegu molekulskih mas, še zlasti med 80-85 kDa.
- Z IgY iz kokošnjega seruma sta reagirala proteina *M. synoviae* ULB01B/P4, ki imata molekulski masi okoli 85 kDa in 90 kDa. To sta verjetno FcR.
- Fc fragment kokošnjih IgY se je pri izolatu ULB01B/P4 vezal na protein(a) z molekulsko maso okoli 82-85 kDa.
- Kokošji serum je reagiral z več pasovi proteinov na membrani kot Fc fragment. Molekulske mase teh proteinov so podobne tistim proteinom, za katere poročajo, da so imunogeni pri *M. synoviae* ali da navzkrižno reagirajo s serumom proti *M. gallisepticum*. Zato je mogoče, da so bili v serumu prisotni specifični IgY proti kateri od teh patogenih bakterij, ki so zelo razširjene.

## 6 POVZETEK

Imunski odziv je pri pticah podoben kot pri sesalcih. V odziv na vdor mikrobov tvorijo proti njihovim imunogenim proteinom protitelesa, ki sestojijo iz Fab in Fc dela, ki jih je možno med seboj ločiti z razgradnjo s papainom. Fab del se neposredno veže na antigen, medtem ko ima Fc del druge efektorske funkcije, ki pospešujejo fagocitozo. Glavno serumsko protitelo pri kokoših je IgY, ki opravlja podobno funkcijo kot sesalčji IgG. Tudi na vdor bakterije *Mycoplasma synoviae* kokoši reagirajo s tvorbo protiteles (Avakian in sod., 1992; Warr in sod., 1995; Narat in sod., 1998; Vozelj, 2000).

Nekatere bakterije imajo na svoji površini molekule, ki lahko vežejo imunoglobuline preko Fc dela. Protein A (*Staphylococcus aureus*) in protein G (nekateri streptokoki skupine C in G) vežeta sesalčje IgG neimunsko, vendar ne vežeta kokošnjih imunoglobulinov. Pri *M. synoviae* so odkrili dva Fc receptorja (FcR) z molekulskima masama, ki pri različnih sevih variirata ( $81 \pm 2,6$  kDa in  $91 \pm 2,0$  kDa) in sta značilna za to vrsto mikoplazem (Lauerma in sod., 1993; Sauer-Eriksson in sod., 1995).

Za identifikacijo Fc receptorjev *M. synoviae* ULB01B/P4 smo kot ligand uporabili Fc fragment kokošnjih IgY. Vzorec proteinov *M. synoviae* ULB01B/P4 smo ločili z NaDS-PAGE in jih iz gela prenesli na membrano, kar je omogočilo izvedbo encimskoimunskega testa. Razlika je seveda v tem, da nismo iskali imunske reakcije med IgY in bakterijskimi molekulami na membrani, ampak smo želeli odkriti, kateri proteini vežejo neimunsko samo Fc del kokošnjih IgY. Zato smo IgY razgradili s papainom in vzorca s produkti te reakcije nanesli na koloni za imunoafinitetno in HPLC kromatografijo za ločitev Fc in Fab fragmentov. Z encimskoimunskim testom DIBA smo testirali frakcije, za katere se je z merjenjem absorbance izkazalo, da imajo največjo koncentracijo proteinov.

Rezultati so pokazali, da nismo uspeli izolirati Fc fragmenta. Razlogi za neuspeh so verjetno v neuspešni oziroma delni razgradnji s papainom, kar bi lahko potrdili, če bi produkte razgradnje ločili z NaDS-PAGE.

Zato smo za nadaljnjo identifikacijo FcR uporabili komercialni Fc fragment kokošjih IgY. Pri poskusu identifikacije Fc receptorjev pri *M. synoviae* ULB01B/P4 s kokošjim serumom smo domnevali, da sta proteina, ki sta reagirala pri približno 85 kDa in 90 kDa ustrezna Fc receptorja. Pri inkubaciji s komercialnim Fc fragmentom smo ugotovili reakcijo proteinov z molekulsko maso približno 82-85 kDa. Zelo verjetno je, da so ti proteini pravi FcR pri sevu ULB01B/P4.

## 7 VIRI

- Avakian A.P., Kleven S.H. 1990. Evaluation of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis purified proteins of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* as antigens in a dot-enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Diseases*, 34: 575-584
- Avakian A.P., Ley D.H., Kleven S.H. 1992. Comparison of *Mycoplasma synoviae* isolates by immunoblotting. *Avian Pathology*, 21: 633-642
- Benčina D. 2002. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Pathology*, 31: 535-547
- Benčina D., Drobnič-Valič M., Horvat S., Narat M., Kleven S.H., Dovč P. 2001. Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. *FEMS Microbiology Letters*, 203: 115-123
- Benčina D., Narat M., Bidovec A., Zorman-Rojs O. 2005. Transfer of maternal immunoglobulins and antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* to the allantoic and amniotic fluid of chicken embryos. *Avian Pathology*, 34, 6: 463-472
- Benčina D., Narat M., Dovč P., Drobnič-Valič M., Habe F., Kleven S.H. 1999. The characterization of *Mycoplasma synoviae* EF-Tu protein and proteins involved in hemadherence and their N-terminal amino acid sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 173: 85-94
- Berčič R.L., Slavec B., Lavrič M., Narat M., Bidovec A., Dovč P., Benčina D. 2007. Identification of major immunogenic proteins of *Mycoplasma synoviae* isolates. *Veterinary Microbiology*, doi:10.1016/j.vetmic.2007.07.020  
<http://www.sciencedirect.com/nukweb.nuk.uni-lj.si/science?ob=ArticleListURL&method=list&ArticleListID=633714592&sort=d&view=c&acct=C000033658&version=1&urlVersion=0&userid=4769578&md5=13b68eb5bf23a82fbc5f72e070965869> (10. okt. 2007): 8 str.
- Biček A. 2004. Mapiranje epitopov na kokošji IgY molekuli z monoklonskimi protitelesi. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 58 str.
- Bradbury J.M. 2005. Poultry mycoplasmas: sophisticated pathogens in simple guise. *British Poultry Science*, 46, 2: 125-136

- Bradley L.D., Snyder D.B., Van Deusen R.A. 1988. Identification of species-specific and interspecies-specific polypeptides of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. American Journal of Veterinary Research, 49, 4: 511-515
- Carlander D. 2002. Avian IgY antibody. *In vitro* and *in vivo*. Doctoral thesis. Uppsala, Uppsala University, Faculty of Medicine: 53 str.
- Carlander D., Kollberg H., Wejåker P.E., Larsson A. 2000. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. Immunologic Research, 21, 1: 1-6
- Carlander D., Larsson A. 2001. Avian antibodies can eliminate interference due to complement activation in ELISA. Uppsala Journal of Medical Sciences, 106: 189-195
- Chambaud I., Wróblewski H., Blanchard A. 1999. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. Trends in Microbiology, 7, 12: 493-499
- Chiou V. 2002. Duck antibodies for IVD applications. IVD Technology for *in vitro* Diagnostics development and manufacturing, April 2002: 31-36.  
<http://www.devicelink.com/ivdt/archive/02/04/003.html> (14. apr. 2007): 4 str.
- Dávalos-Pantoja L., Ortega-Vinuesa J.L., Bastos-González D., Hidalgo-Álvarez R. 2000. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 11, 6: 657-673
- Dufour-Gesbert F., Dheilily A., Marois C., Kempf I. 2006. Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. Veterinary Microbiology, 114: 148-154
- Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G. 2002. Textbook of veterinary anatomy. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia, Saunders: 840 str.
- Forsgren A., Syöquist J. 1966. »Protein A« from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human  $\gamma$ -globulin. Journal of Immunology, 97, 6: 822-827
- Gassmann M., Thömmes P., Weiser T., Hübscher U. 1990. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 4: 2528-2532
- Gurevich V.A., Ley D.H., Markham J.F., Whithear K.G., Walker I.D. 1995. Identification of *Mycoplasma synoviae* immunogenic surface proteins and their potential use as antigens in the enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Diseases, 39: 465-474

- Harlow E., Lane D. 1988. *Antibodies – a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory: 726 str.
- Haugland R.P. 2005. *The handbook. A guide to fluorescent probes and labelling technologies*. 10<sup>th</sup> ed. Eugene, OR, Invitrogen: 1136 str.  
<http://probes.invitrogen.com/handbook/> (6. maj 2007)
- Kleven S.H. 2003. *Mycoplasma synoviae* infection. V: *Diseases of poultry*. 11<sup>th</sup> ed. Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson R.J., Fadly A.M., McDougald L.R., Swayne D.E. (eds.). Ames, Iowa State University Press: 756-766
- Kowalczyk K., Daiss J., Halpern J., Roth T.F. 1985. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunology*, 54: 755-762
- Kronvall G. 1973. A surface component in group A, C and G streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin G. *Journal of Immunology*, 111, 5: 1401-1406
- Larsson A., Wejåkar P.E., Forsberg P.O., Lindahl T. 1992. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *Journal of Immunological Methods*, 156: 79-83
- Lauerma L.H. 2005. »Fc receptor of mycoplasma«. Auburn, Alabama, Charles S. Roberts Veterinary Diagnostic Laboratory, Department of Agriculture and Industries.  
[lhlaerman@mindspring.com](mailto:lhlaerman@mindspring.com) (osebni vir, 2005)
- Lauerma L.H., Reynolds-Vaughn R.A. 1991. Immunoglobulin G Fc receptors of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 35: 135-138
- Lauerma L.H., Shah S.M., Williams J.C., Corsiglia C.M., Herring R.J. 1993. Immunoglobulin receptors used in avian mycoplasma identification. *Avian Diseases*, 37: 1080-1084
- Lavrič M., Benčina D., Kothlow S., Kaspers B., Narat M. 2007. *Mycoplasma synoviae* lipoprotein MSPB, the N-terminal part of VlhA haemagglutinin, induces secretion of nitric oxide, IL-6 and IL-1 $\beta$  in chicken macrophages. *Veterinary Microbiology*, 121: 278-287
- Lockaby S.B., Hoerr F.J., Lauerma L.H., Kleven S.H. 1998. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in broiler chickens. *Veterinary Pathology*, 35: 178-190



- Lockaby S.B., Hoerr F.J., Lauerman L.H., Smith B.F., Samoylov A.M., Toivio-Kinnucan M.A., Kleven S.H. 1999. Factors associated with virulence of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 43: 251-261
- Loeken M.R., Roth T.F. 1983. Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. *Immunology*, 49: 21-28
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10<sup>th</sup> ed. Upper Saddle River, Prentice-Hall: Pearson Education, Inc.: 1019 str.
- Matsuda H., Mitsuda M., Nakamura N., Furusawa S., Mohri S., Kitamoto T. 1999. A chicken monoclonal antibody with specificity for the N-terminal of human prion protein. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 23: 189-194
- Matsushita K., Horiuchi H., Furusawa S., Horiuchi M., Shinagawa M., Matsuda H. 1998. Chicken monoclonal antibodies against synthetic bovine prion protein peptide. *Journal of Veterinary and Medical Science*, 60, 6: 777-779
- Narat M. 2003. Production of antibodies in chickens. *Food Technology and Biotechnology*, 41, 3: 259-267
- Narat M., Benčina D., Kleven S.H., Habe F. 1998. The hemagglutination-positive phenotype of *Mycoplasma synoviae* induces experimental infectious synovitis in chickens more frequently than does the hemagglutination-negative phenotype. *Infection and Immunity*, 66, 12: 6004-6009
- Noormohammadi A.H., Markham P.F., Duffy M.F., Whithear K.G., Browning G.F. 1998. Multigene families encoding the major hemagglutinins in phylogenetically distinct mycoplasmas. *Infection and Immunity*, 66, 7: 3470-3475
- Noormohammadi A.H., Markham P.F., Kanci A., Whithear K.G., Browning G.F. 2000. A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. *Molecular Microbiology*, 35, 4:911-923
- Noormohammadi A.H., Markham P.F., Whithear K.G., Walker I.D., Gurevich V.A., Ley D.H., Browning G.F. 1997. *Mycoplasma synoviae* has two distinct phase-variable major membrane antigens, one of which is a putative hemagglutinin. *Infection and Immunity*, 65, 7: 2542-2547
- O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 10: 4007-4021

- Papazisi L., Gorton T.S., Kutish G., Markham P.F., Browning G.F., Nguyen D.K., Swartzell S., Madan A., Mahairas G., Geary S.J. 2003. The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain R<sub>Low</sub>. *Microbiology*, 149: 2307-2316
- Ramírez A.S., Naylor C.J., Hammond P.P., Bradbury J.M. 2006. Development and evaluation of a diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the intergenic spacer region and the 23S rRNA gene. *Veterinary Microbiology*, 118: 76-82
- Razin S., Yogev D., Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 4: 1094-1156
- Rejc M. 1999. Priprava s peroksidazo konjugiranih monoklonskih protiteles proti kokošjim imunoglobulinom razreda G (IgY). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 79 str.
- Rottem S., Naot Y. 1998. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. *Trends in Microbiology*, 6, 11: 436-440
- Salisch H., Ryli M., Leise R., Neumann U. 2000. Use of an alkaline phosphatase-labelled probe for the detection of *Mycoplasma synoviae* in chickens. *Journal of Veterinary Medicine B*, 47: 27-35
- Sauer-Eriksson A.E., Kleywegt G.J., Uhlén M., Jones T.A. 1995. Crystal structure of the C2 fragment of streptococcal protein G in complex with the Fc domain of human IgG. *Structure*, 3: 265-278
- Schmidt P., Erhard M.H., Schams D., Hafner A., Folger S., Löscher U. 1993. Chicken egg antibodies for immunohistochemical labeling of growth hormone and prolactin in bovine pituitary gland. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41, 9: 1441-1446
- Slavec B. 2006. Molekularno ozadje nastanka različic hemaglutinina VlhA pri bakteriji *Mycoplasma synoviae*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 162 str.
- Suzuki N., Lee Y.C. 2004. Site-specific N-glycosylation of chicken serum IgG. *Glycobiology*, 14, 3: 275-292
- Tini M., Jewell U.R., Camenisch G., Chilov D., Gassmann C.M. 2002. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 131: 569-574

- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 76, 9: 4350-4354
- Vasconcelos A.T.R., Ferreira H.B., Bizarro C.V., Bonatto S.L., Carvalho M.O., Pinto P.M., Almeida D.F., Almeida L.G.P., Almeida R., Alves-Filho L., Assunção E.N., Azevedo V.A.C., Bogo M.R., Brigido M.M., Brocchi M., Burity H.A., Camargo A.A., Camargo S.S., Carepo M.S., Carraro D.M., de Mattos Cascardo J.C., Castro L.A., Cavalcanti G., Chemale G., Collevatti R.G., Cunha C.W., Dallagiovanna B., Dambrós B.P., Dellagostin O.A., Falcão C., Fantinatti-Garboggini F., Felipe M.S.S., Fiorentin L., Franco G.R., Freitas N.S.A., Frías D., Grangeiro T.B., Grisard E.C., Guimarães C.T., Hungria M., Jardim S.N., Krieger M.A., Laurino J.P., Lima L.F.A., Lopes M.I., Loreto É.L.S., Madeira H.M.F., Manfio G.P., Maranhão A.Q., Martinkovics C.T., Medeiros S.R.B., Moreira M.A.M., Neiva M., Ramalho-Neto C.E., Nicolás M.F., Oliveira S.C., Paixão 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., Urmenyi T.P., Vainstein M.H., Zuccherato L.W., Simpson A.J.G., Zaha A. 2005. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology*, 187, 16: 5568-5577
- Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. 1. izd. Ljubljana, DZS: 550 str.
- Warr G.W., Magor K.E., Higgins D.A. 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*, 16, 8: 392-398
- West A.P. Jr., Herr A.B., Bjorkman P.J. 2004. The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A<sub>2</sub> receptor homolog. *Immunity*, 20: 601-610
- Wigley P., Kaiser P. 2003. Avian cytokines in health and disease. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 5, 1: 1-14  
<http://www.devicelink.com/ivdt/archive/02/04/003.html> (15. apr. 2007): 14 str.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. Mojci Narat, za vodenje, pomoč in nasvete pri izvedbi diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi znanstvenemu svetniku dr. Dušanu Benčini za hiter in temeljit pregled diplomskega dela in koristne pripombe.

Prav tako se zahvaljujem tudi vsem tistim na Oddelku za zootehniko, ki so mi pri praktičnem delu v laboratoriju kakorkoli priskočili na pomoč.

Nenazadnje se za podporo in zaupanje med študijem zahvaljujem svojima staršema.

Vsem bližnjim se zahvaljujem tudi za spodbudo in veliko razumevanja, še zlasti v zadnjem času.

Hvala vsem.