

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Teja ZAKRAJŠEK

NEVRAMINIDAZNA AKTIVNOST BAKTERIJE *Mycoplasma canis*

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**NEURAMINIDASE ACTIVITY OF THE BACTERIUM *Mycoplasma
canis***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

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

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

Mentorica: prof. dr. Mojca NARAT

Recenzent: znanstveni svetnik dr. Dušan BENČINA

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Mojca NARAT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: znanstveni svetnik dr. Dušan BENČINA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Teja Zakrajšek 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.

Teja ZAKRAJŠEK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.121.5/.6: 579.887 (043)=163.6
KG	encimi/sialidaza/nevraminidaza/nevraminidazna aktivnost/mikoplazme/ Mollicutes/ <i>Mycoplasma</i> / <i>Mycoplasma canis</i>
AV	ZAKRAJŠEK, Teja
SA	NARAT, Mojca (mentorica)/BENČINA, Dušan (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	NEVRAMINIDAZNA AKTIVNOST BAKTERIJE <i>Mycoplasma canis</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 64 str., 19 pregl., 6 sl., 100 vir.
IJ	sl
JI	sl/an
AI	Večina mikroorganizmov, ki večji del svojega življenja preživijo kot komezali ali fakultativni patogeni, pogosto sintetizira nevraminidazo, ki je pomemben virulenčni faktor. Pri mikoplazmah je nevraminidazna aktivnost redka. Nevraminidaza (sialidaza) je eksoglukozidaza, ki hidrolizira z α -glikozidno vezjo vezano sialično kislino na glikoproteine, glikolipide in oligosaharide. Pri bakteriji <i>Mycoplasma canis</i> smo dokazali nevraminidazno aktivnost z relativno hitrim testom. S preverjanjem nevraminidazne aktivnosti v celični suspenziji, rastnem mediju, membranski in citoplazemski frakciji smo dokazali, da <i>M. canis</i> sintetizira na membrano vezano nevraminidazo. Nevraminidazna aktivnost <i>M. canis</i> je relativno močna in s starostjo kulture narašča. Optimalno delovanje encima je pri pH 9. Ob prisotnosti Ca^{2+} ioni so reakcije hitrejše. Segrevanje celične suspenzije na 55 °C za eno uro popolnoma inaktivira nevraminidazo. Po ločitvi proteinov <i>M. canis</i> s SDS-PAGE elektroforezo in prenosu proteinov iz gela na membrano smo določili N-terminalno sekvenco proteina z molekulska masa 140 kDa. Ta molekulska masa je namreč enaka molekulska masi proteina z nevraminidazno aktivnostjo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDK 577.121.5/.6: 579.887 (043)=163.6
CX	enzymes/sialidase/neuraminidase/neuraminidase activity/mycoplasmas/ Mollicutes/ <i>Mycoplasma</i> / <i>Mycoplasma canis</i>
AU	ZAKRAJŠEK, Teja
AA	NARAT, Mojca (supervisor)/BENČINA, Dušan (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2008
TI	NEURAMINIDASE ACTIVITY OF THE BACTERIUM <i>Mycoplasma canis</i>
DT	Graduation thesis (university studies)
NO	XI, 64 p., 19 tab., 6 fig., 100 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Most of the microorganisms that have close contact with animals as commensals or facultative pathogens produce neuraminidase, which is an important virulence factor. Neuraminidase activity is rare in mycoplasmas. Neuraminidase is exo-glucosidase which hydrolyses α -glycosidically bound sialic acids which are mostly found as terminal constituents of glycoproteins, glycolipids and oligosaccharides. We determined neuraminidase activity of <i>Mycoplasma canis</i> with relatively rapid test. Different samples were assayed for neuraminidase activity: cell suspension, growth medium, membrane fraction and cytoplasmatic fraction. We demonstrated that <i>M. canis</i> produce membrane-bound neuraminidase. <i>M. canis</i> exhibited relatively strong neuraminidase activity, which increases by the age of culture. The maximum enzyme activity was detected at pH 9. When Ca^{2+} ions are present reactions are faster. Cell suspension heated at 55 °C for one hour showed complete loss of activity. We separated proteins of <i>M. canis</i> with SDS-PAGE. After the transfer of separated proteins from gel to membrane we determined N-terminal amino acids sequence of the protein with molecular mass 140 kDa. This molecular mass was identical to molecular mass of protein with neuraminidase activity.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 RAZRED <i>Mollicutes</i>	4
2.1.1 Taksonomija in filogenija	5
2.2 ROD <i>Mycoplasma</i>	8
2.2.1 Membrana	8
2.2.2 Gibljivost	9
2.2.3 Genom	9
2.2.4 Naravni habitat	9
2.2.5 Patogeneza	10
2.3 MIKOPLAZME PRI PSIH	12
2.3.1 <i>Mycoplasma canis</i>	14
2.4 SIALIČNA KISLINA	15
2.4.1 Struktura sialične kisline	15
2.4.2 Vloga sialične kisline v patogenezi	17
2.4.3 Načini pridobivanja sialične kisline	17
2.5 NEVRAMINIDAZA	19
2.5.1 Geni za nevraminidaze	19
2.5.2 Substrati	19

2.5.3	Tipi in molekulske mase nevraminidaz	20
2.5.4	Optimalni pH in temperatura	20
2.5.5	Vloga nevraminidaze v patogenezi	20
2.5.6	Nevraminidaze pri mikoplazmah	21
3	MATERIALI IN METODE	22
3.1	GOJENJE BAKTERIJSKE KULTURE	22
3.2	PRIPRAVA VZORCEV ZA TESTIRANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI	22
3.2.1	Priprava supernatanta in suspenzije celic	22
3.2.2	Priprava membranske frakcije in frakcije s citoplazemsko vsebino	23
3.3	DOLOČANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI	23
3.3.1	Določanje nevraminidazne aktivnost s fluorogenim substratom	24
3.3.2	Določanje nevraminidazne aktivnosti s kromogenim substratom	24
3.4	PREVERJANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI CELIC <i>M. canis</i> VEZANIH NA MEMBRANO	25
3.5	TEMPERATURA INAKTIVACIJE NEVRAMINIDAZE	25
3.6	DOLOČANJE pH OPTIMUMA REAKCIJE IN VPLIVA KALCIJEVIH IONOV	26
3.7	SDS POLIAKRILAMIDNA ELEKTROFOREZA (SDS-PAGE)	26
3.7.1	Elektroforeza	26
3.7.1.1	Priprava vzorcev	27
3.7.1.2	Referenčni markerji	27
3.7.1.3	Pogoji in potek elektroforeze	28
3.7.2	Barvanje gela	29
3.7.3	Mini SDS elektroforeza	29
3.8	PRENOS PROTEINOV IZ GELA NA MEMBRANO	29
4	REZULTATI	33
4.1	NEVRAMINIDAZNA AKTIVNOSTI <i>M. canis</i>	33
4.2	DOKAZOVANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI PRI <i>M. canis</i>	33

4.3	PREVERJANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI CELIC <i>M. canis</i> VEZANIH NA MEMBRANO	34
4.4	TIP NEVRAMINIDAZE	35
4.5	VREDNOTENJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI	37
4.6	VPLIV pH IN KALCIJEVIH IONOV NA NEVRAMINIDAZNO AKTIVNOST	38
4.7	VPLIV TEMPERATURE NA NEVRAMINIDAZNO AKTIVNOST	39
4.8	AKTIVNOST NEVRAMINIDAZE V ODVISNOSTI OD STAROSTI KULTURE	40
4.9	POSKUS IDENTIFIKACIJE NEVRAMINIDAZE V PROTEINSKEM PROFILU <i>M. canis</i>	42
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	44
5.1	RAZPRAVA	44
5.2	SKLEPI	49
6	POVZETEK	50
7	VIRI	51
8	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Filogenetsko drevo, izrisano na podlagi 16S rRNA analiz, s štirimi od petih skupin ter z vsemi gručami znotraj skupine Hominis (Chalker in Brownlie, 2004: 540).	13
Slika 2: Struktura N-acetilnevraminske kisline (Neu5Ac) in N-glikolilnevraminske kisline (Neu5Gc) (Vimr in sod., 2004: 133).	16
Slika 3: Shematski prikaz postopkov pridobivanja vzorcev: celic, membran in citoplazme.	31
Slika 4: Nevraminidazna aktivnost celic <i>M. canis</i> vezanih na membrano, ki je bila nato blokirana v 0,5% Tween 20 PBS (30 min).	34
Slika 5: Nevraminidazna aktivnost celic <i>M. canis</i> vezanih na neblokirano membrano.	34
Slika 6: Profil proteinov <i>M. canis</i> v gelu po SDS poliakrilamidni elektroforezi.	42

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Taksonomija razreda <i>Mollicutes</i> (Appendix... , 2005: 207-220).	5
Preglednica 2: Filogenetske skupine, gručice in podgručice razreda <i>Mollicutes</i> (Johansson in Pettersson, 2002: 13).	7
Preglednica 3: Koncentracije in sestava štirih različnih vzorcev za nanos na elektroforezo pripravljenih iz suspenzije celic <i>M. canis</i> .	27
Preglednica 4: Kemikalije za pripravo 8 % ločevalnega gela.	28
Preglednica 5: Kemikalije za pripravo 4 % nanašalnega gela.	28
Preglednica 6: Vzorci in testi opravljeni s posameznimi vzorci.	32
Preglednica 7: Nevraminidazna aktivnost celične suspenzije <i>M. canis</i> .	33
Preglednica 8: Nevraminidazna aktivnost celic <i>M. canis</i> vezanih na blokirano membrano.	34
Preglednica 9: Nevraminidazna aktivnost celic <i>M. canis</i> vezanih na neblokirano membrano.	35
Preglednica 10: Nevraminidazna aktivnost v gojišču, v katerem je rastla <i>M. canis</i> .	35
Preglednica 11: Nevraminidazna aktivnost vzorcev M in CF redčenih 1 : 20.	36
Preglednica 12: Nevraminidazna aktivnost suspenzije celic <i>M. canis</i> .	37
Preglednica 13: Merjenje nevraminidazne aktivnosti pri različnih pH vrednostih brez CaCl ₂ .	38
Preglednica 14: Merjenje nevraminidazne aktivnosti pri različnih pH vrednostih z 10 mM CaCl ₂ .	38
Preglednica 15: Temperature enourne inkubacije in čas zaznave nevraminidazne aktivnosti.	39

Preglednica 16: Nevraminidazna aktivnost suspenzije celic 3 dni stare kulture *M. canis* (100-krat skoncentrirane celice v PBS s pH 7,2). 40

Preglednica 17: Nevraminidazna aktivnost suspenzije celic 4 dni stare kulture *M. canis* (100-krat skoncentrirane celice v PBS s pH 7,2). 40

Preglednica 18: Nevraminidazna aktivnost suspenzije celic 5 dni stare kulture *M. canis* (100-krat skoncentrirane celice v PBS s pH 7,2). 41

Preglednica 19: Nevraminidazna aktivnost suspenzije celic 5 dni stare kulture *M. canis* (100-krat skoncentrirane celice v PBS s CaCl₂ in pH 9). 41

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APS	amonijev persulfat
BIN	sol 5-bromo-4-kloro-3-indolil- α -D-N-acetilnevraminske kisline
CAPS	3-cikloheksilamino 1-propansulfonska kislina
CFU	število enot, ki tvori kolonije (<u>c</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nits)
ddH ₂ O	dvojno destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EBP	pufer za prenos proteinov iz gela na membrano (<u>e</u> lektro <u>b</u> loting pufer)
kDa	kilodalton, enota za molekulsko maso
MUAN	2'-(4-metillumbeliferil)- α -D-N-acetilneuraminska kislina
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
PBS	fosfatni pufer (<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffer <u>s</u> olution)
SDS	natrijev dodecil sulfat
SDS PAGE	elektroforeza v poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom
TEMED	tetrametiletilendiamin
TRIS	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol
Tween 20	neionski detergent

1 UVOD

Mikoplazme so posebna skupina mikroorganizmov, uvrščenih v razred *Mollicutes*. Glavni značilnosti predstavnikov tega razreda sta majhen genom in odsotnost celične stene. So najmanjše bakterije, ki so zmožne samostojnega podvojevanja (Razin in sod., 1998). *Mycoplasma genitalium* ima najmanjši poznani bakterijski genom. Mikoplazme imajo le plazemsko membrano, ribosome in krožno dvoverižno molekulo DNA (Razin, 1999).

Mikoplazme so komenzali ali paraziti ljudi, živali in rastlin. Povzročajo kronične, običajno blage okužbe in le redko ubijejo gostitelja. V tem pogledu so mikoplazme blizu koncepta o idealnem parazitu. Običajno so površinski paraziti, ki se pritrdijo na površino epitelija določenega organa in ga kolonizirajo. Navadno kolonizirajo epitelij respiratornega in urogenitalnega trakta ter oči, mlečne žleze ali sklepe in le redko prodirajo v tkiva (Razin, 1999; Fraser in sod., 1995; Himmelreich in sod., 1996). *Mycoplasma canis* (*M. canis*) je patogena bakterija psov. Izolirali so jo iz psov z urogenitalnimi okužbami in neplodnostjo, vendar še ni znano, ali je povzročiteljica bolezni ali je le del mikroflore med okužbo (L'Abée-Lund in sod., 2003). Pri poskusno okuženih psih z *M. canis* sta se razvila kronični uretritis in epididimitis, pri psih pa so opazili povečanje maternice in vnetje maternične sluznice (Rosendal, 1982).

V patogenezi bakterij ima pomembno vlogo tudi sialična kislina oz. nevraminska kislina. Bakterije sialično kislino gostiteljev lahko uporabljajo kot receptorje za vezavo na gostiteljske celice, kot vir dušika in ogljika ter za izmikanje imunskemu sistemu gostitelja (Roberts in sod., 1989; Vimr in sod., 2004; Severi in sod., 2005; Harvey in sod., 2001). V gostitelju je sialična kislina običajno terminalni del glikoproteinov, glikolipidov in oligosaharidov, na katere je navadno vezana z α -glikozidno vezjo (Vimr in sod., 2004).

Bakterije sialično kislino lahko pridobijo s sintezo *de novo* ali od gostitelja (Vimr in Lichtensteiger, 2002; Vimr in sod., 2004). Za pridobivanje sialične kisline od gostitelja, potrebujejo patogene bakterije nevraminidazo oziroma sialidazo, ki cepi terminalno vezano sialično kislino. Nekatere bakterije same sintetizirajo nevraminidazo, druge pa izkoriščajo sialično kislino, ki se je sprostila po hidrolizi z nevraminidazami drugih bakterij, ki so

istočasno prisotne v gostitelju ali nevraminidaz gostitelja, ki se običajno pojavijo med vnetjem (Shakhnovich in sod., 2002; Sohanpal in sod., 2004).

Nevraminidazo so dokazali v celicah ljudi in višjih metazojev (Deuterostomia) ter nekaterih mikroorganizmih in sicer predvsem tistih, ki večino svojega življenjskega cikla preživijo kot komenzali ali patogeni. Nevraminidazo imajo nekatere glive, protozoi, bakterije in virusi (Roggentin in sod., 1993). Na nivoju mikroorganizmov so geni za sintezo nevraminidaze zelo neenakomerno razporejeni, zato predvidevajo, da sinteza nevraminidaze ni esencialna za preživetje, predstavlja pa veliko prednost pri pridobivanju hranil in patogenezi mikroorganizma (Grobe in sod., 1998; Corfield, 1992). Zapis za nevraminidazo se pri večini mikroorganizmov nahaja v genih *nan*. Doslej opisanim aminokislinskim sekvencam nevraminidaz sta skupna dva ohranjena motiva: motiv FRIP in Asp škatla (Roggentin in sod., 1993).

Nevraminidaza je intracelularna, ekstracelularna ali pa vezana na membrano (Roggentin in sod., 1993). Velikosti nevraminidaz so različne, molekulske mase večine pa so med 40 kDa in 125 kDa. Redki mikroorganizmi sintetizirajo nevraminidaze z večjimi molekulskimi masami (Abrashv in Dulguerova, 2000). Optimalni pH delovanja bakterijskih nevraminidaz je med 5 in 7. Temperaturni optimum večine nevraminidaz je podoben telesni temperaturi gostiteljev, in sicer 35-40 °C (Abrashv in Dulguerova, 2000). Osrednja vloga nevraminidaze ni natančno določena. Bakterijam omogoča lažje širjenje v gostitelju, pridobivanje hranil, lahko so vpletene v nastanek avtoimunskega odziva gostitelja med okužbo (Ernst in sod., 1995; Matsushita in Okabe, 2001; Roggentin in sod., 1988; Biberfeld, 1979; Kahane in sod., 1990).

1.1 NAMEN DELA

Namen dela je bil ugotoviti ali ima *M. canis* nevraminidazno aktivnost in s tem posredno sklepati na prisotnost encima nevraminidaze ter vsaj delno opisati njegove značilnosti. Nevraminidazi smo želeli določiti pH optimum delovanja ter temperaturno območje delovanja. Zanimalo nas je, ali bakterija sintetizira intracelularni, ekstracelularni ali

membransko vezani encim z nevraminidazno aktivnostjo. Želeli smo določiti tip encima glede na to, kje se nahaja (v gojišču, pripet na membrano ali znotraj celice). Predvidevali smo, da bomo lahko po ločitvi celičnih proteinov s pomočjo elektroforeze v poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE) in njihovem prenosu na membrano s preverjanjem aktivnosti uspeli identificirati encim in določiti njegovo približno molekularno maso.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAZRED *Mollicutes*

V razred *Mollicutes* so uvrščene bakterije brez celične stene. Ime razreda izhaja iz glavne značilnosti (odsotnost celične stene) mikroorganizmov (latinsko *mollis* - mehek; *cutis* - koža). Za mikroorganizme razreda *Mollicutes* so značilne tudi druge lastnosti, po katerih se razlikujejo od ostalih mikroorganizmov ter med seboj (Razin in sod., 1998). So najmanjši znani prokarionti, ki niso obvezni znotrajcelični paraziti in so sposobni samostojnega razmnoževanja, imajo majhen genom, majhno število rRNA operonov in tRNA genov ter omejeno metabolno aktivnost (Bove, 1993).

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

Mikroorganizmi, ki so uvrščeni v razred *Mollicutes* so popolnoma odvisni od svojih gostiteljev ter njihovih hranil (Trachtenberg, 2005). Z analizami 16S rRNA genov so ugotovili, da so se *Mollicutes* razvili iz po Gramu pozitivnih bakterij z nizkim deležem gvanina in citozina (G+C) pred približno 605 milijoni let. Najverjetneje so se razvili iz klostridijev. Prednik predstavnikov razreda *Mollicutes* je najverjetneje izgubil možnost sinteze celične stene, nekatere biosintetske poti in rRNA gene, zaradi česar se je njegov genom zmanjšal. Prednik najverjetneje ni bil obligatni parazit in ni potreboval holesterola za rast in replikacijo. Pred 470 milijoni let pa so se mikroorganizmi razreda *Mollicutes* ločili v dve glavni filogenetski veji: eno vejo predstavljajo rodovi *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma* in *Phytoplasma*, drugo vejo pa rodovi *Spiroplasma*, *Mesoplasma*, *Entomoplasma*, *Mycoplasma* in *Ureaplasma* (Maniloff, 2002).

2.1.1 Taksonomija in filogenija

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

Preglednica 1: Taksonomija razreda *Mollicutes* (Appendix... , 2005: 207-220).

Razred II. *Mollicutes*

Red I. *Mycoplasmatales*

- Družina I. *Mycoplasmataceae*
 - Rod I. *Mycoplasma*
 - Rod II. *Eperythrozoon*
 - Rod III. *Haemobartonella*
 - Rod IV. *Ureaplasma*

Red II. *Entomoplasmatales*

- Družina I. *Entomoplasmataceae*
 - Rod I. *Entomoplasma*
 - Rod II. *Mesoplasma*
- Družina II. *Spiroplasmataceae*
 - Rod I. *Spiroplasma*

Red III. *Acholeplasmatales*

- Družina I. *Acholeplasmataceae*
 - Rod I. *Acholeplasma*
 - Rod II. *Phytoplasma*

Red IV. *Anaeroplasmatales*

- Družina I. *Anaeroplasmataceae*
 - Rod I. *Anaeroplasma*
 - Rod II. *Asteroleplasma*

Red V. Incerate sedis

- Družina I. *Erysipelotrichaceae*
 - Rod I. *Erysipelotrix*
 - Rod II. *Bulleidia*
 - Rod III. *Holdemania*
 - Rod IV. *Solobacterium*
-

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

Do danes je poznanih 113 vrst in podvrst rodu *Mycoplasma*. Je največji rod znotraj razreda *Mollicutes*. Eden največjih problemov, povezanih s taksonomijo in filogenijo v razredu *Mollicutes* je uvrstitev vrst rodu *Mycoplasma* v štiri od petih skupin. Rod *Mycoplasma* ni monofiletski. *Mycoplasma feliminutum* je uvrščena v skupino anaeroplazem, gruča *M. mycoides* pa je uvrščena v skupino spiroplazem. V skupino pneumnoniae je uvrščenih sedem vrst rodu *Ureaplasma*. Le skupina hominis je sestavljena le iz vrst rodu *Mycoplasma* (Johansson in Pettersson, 2002).

2.2 ROD *Mycoplasma*

Mikoplazme so pleomorfni oblik. Ker jih obdaja le celična membrana, so običajno okrogle, s premerom 0,3-0,8 μm . Nekatere vrste mikoplazem so lahko hruškaste oblike s pritrditvenim organelom na terminalnem delu ali pa tvorijo filamente različnih dolžin, ki so lahko razvejani. Mikoplazme se po Gramu barvajo negativno (Razin, 1978). Zaradi manjkajoče celične stene so občutljive na osmotski šok in detergente, odporne proti penicilinu in na agarških gojiščih rastejo v obliki kolonij, katerih oblika spominja na ocvrto jajce (Razin in Oliver, 1961).

2.2.1 Membrana

Mikoplazme se od ostalih prokariontov ločijo po tem, da nimajo celične stene in znotrajceličnih membranskih struktur. Dejstvo, da imajo mikoplazme le en tip membrane (plazemsko membrano), je zelo uporabna lastnost za študije membran, saj smo lahko prepričani, da po izolaciji plazemske membrane naš vzorec ni kontaminiran z ostalimi tipi membran. Pri mnogih mikoplazmah lahko za izolacijo membrane uporabimo enostavne tehnike osmotske lize za ločitev membrane od citoplazemske vsebine (Rodwell in Whitcomb, 1983).

Dve tretjini mase membrane predstavljajo proteini, ostalo so lipidi. Mikoplazme imajo zelo velik delež lipoproteinov, kar za ostale prokarionte (ki imajo le omejeno število lipoproteinov) ni značilno. Lipoproteini so glavni antigeni mikoplazem. Membrana mikoplazem je tako kot večina bioloških membran zgrajena iz fosfolipidov, glikolipidov in nevtralnih lipidov. Mikoplazme so popolnoma ali delno nezmožne sinteze maščobnih kislin, zato izkoriščajo gostiteljeve. So edini prokarionti, ki za svojo rast potrebujejo holesterol, ki ga prav tako ne morejo sintetizirati. Holesterol je pomemben pri uravnavanju fluidnosti membrane (Razin in sod., 1998).

2.2.2 Gibljivost

Večina mikoplazem je negibljivih in nimajo bičkov. Vendar pa nekatere hruškasto oblikovane vrste rodu *Mycoplasma* (vključno s patogenimi za ljudi in živali - *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. gallisepticum*, *M. pulmonis* in *M. mobile*) polzijo na mokrih površinah. Mehanizem polzenja še vedno ni poznan (Trachtenberg, 1998; Miyata in Seto, 1999). Med polzenjem najverjetneje igra pomembno vlogo pritrditveni organel, ki se med gibanjem nahaja na tistem polu bakterije, ki je obrnjen v smer gibanja (Miyata in Uenoyama, 2002).

2.2.3 Genom

Genom mikoplazem je tipično prokariontski, v obliki dvoverižne krožne DNA molekule, katere značilnost je visoka vsebnost timina in adenina ter nizka vsebnost gvanina in citozina. So mikroorganizmi z najmanjšim genomom. Velikost genoma je med 580 kbp (*Mycoplasma genitalium*) in 1380 kbp (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC) in variira tudi med sevi iste vrste (Vasconcelos in sod., 2005). Mikoplazme UGA kodona ne uporabljajo kot stop kodona, temveč kodira triptofan, kar je značilno tudi za mitohondrije (Osawa in sod., 1992). Posledica redukcije genoma so počasnejša rast in sinteza proteinov ter odvisnost od hranil gostitelja (maščobnih kislin, holesterola, vitaminov, purinov, pirimidinov in aminokislin). Izven gostitelja ne preživijo dolgo (Razin in sod., 1998).

2.2.4 Naravni habitat

Naravni habitati živalskih in človeških mikoplazem so sluznice dihalnega in urogenitalnega trakta, oči, mlečne žleze in sklepi. Okužbe, ki jih povzročajo, so običajno blage in kronične, poškodbe, ki nastanejo, pa so večkrat tudi posledica imunskega odziva gostitelja. Pravzaprav so mikoplazme »idealni paraziti«, ki navadno dolgo preživijo v gostitelju (Razin, 1998). Zaradi hranilne odvisnosti od gostitelja in parazitskega načina življenja so njihovi gostitelji in okužena tkiva specifični (Razin in sod., 1998).

2.2.5 Patogeneza

Mikoplazme se v gostitelju razmnožijo in preživijo v njem zelo dolgo časa. Razvile so mehanizme, ki jim pomagajo pri izmikljanju imunskemu sistemu gostitelja ter prenosu med gostitelji. Pri izmikljanju imunskemu sistemu gostitelja jim pomagajo mimikrija gostiteljskih antigenov, preživetje znotraj fagocitirajočih in nefagocitirajočih celic ter fenotipska variabilnost (Rottem, 2003).

Zmožnost kolonizacije in okužbe je pri večini mikoplazem odvisna od pritrditve na gostiteljske celice. Najbolje proučena mehanizma pritrditve sta pri *M. pneumoniae* in *M. genitalium*. Za pritrditev je najpomembnejši tako imenovani pritrditveni organel na enem od polov bakterije. Najpomembnejši proteini organela *M. pneumoniae* so adhezin P1, P30 ter pomožni proteini P40, P90, HMW-1 in HMW-3 (Dallo in sod., 1990; Dirksen in sod., 1996; Inamine in sod., 1988; Krause, 1996; Krause in sod., 1982). Nekatere mikoplazme, kot npr. *M. penetrans*, ki so jo našli v urogenitalnem traktu bolnikov z AIDS-om, so razvile mehanizem, s katerim vstopijo v nefagocitirajoče celice. Celice preživijo in se delijo v veziklih gostiteljskih celic (Lo, 1992; Lo in sod., 1993). Odsotnost celične stene omogoča direkten kontakt med citoplazemsko membrano mikoplazem in gostiteljskimi celicami. V ustreznih pogojih zato lahko pride do zlitja med celicama (Rottem, 2003).

Mehanizmov, s katerimi poškodujejo gostiteljske celice, je več:

- a) V reduktivni evoluciji so mikoplazme izgubile skoraj vse gene za biosintezo aminokislin, maščobnih kislin, kofaktorjev in vitaminov in zato te prekurzorje za biosintezo potrebujejo od gostitelja. Nefermentirajoče *Mycoplasma spp.* ATP pridobivajo z arginin dihidrolazno potjo in tako zelo hitro izčrpajo rezerve arginina, to pa vpliva na sintezo proteinov, delitev in rast gostiteljskih celic (Pollack in sod., 1997; Razin in sod., 1998; Rottem in Barile, 1993). Nekateri sevi povzročajo celo lom kromosomov, multiple translokacije in redukcijo števila kromosomov. To naj bi bila posledica preprečene sinteze histonov zaradi pomanjkanja arginina (McGarrity in sod., 1992).

- b) Pritrditev mikoplazem na površino celic ovira dostop do membranskih receptorjev ali pa spremeni transportne mehanizme gostiteljskih celic (Rottem, 2003). Čeprav mikoplazme ne sintetizirajo klasičnih bakterijskih toksinov, pa lahko s toksičnimi metaboliti (peroksidom in superoksidnimi radikali) in citolitičnimi encimi (fosfolipazami) poškodujejo celice (Almagor in sod., 1986; Shibata in sod., 1995).
- c) Tretji mehanizem ni točno definiran, najverjetneje pa gre za zlitje mikoplazem z gostiteljskimi celicami. Z zlitjem se komponente mikoplazem sprostijo v citoplazmo gostiteljskih celic in vplivajo na normalne funkcije celic. Nukleaze mikoplazem lahko razgradijo DNA evkariontskih celic (Paddenberg in sod., 1998; Paddenberg in sod., 1996).

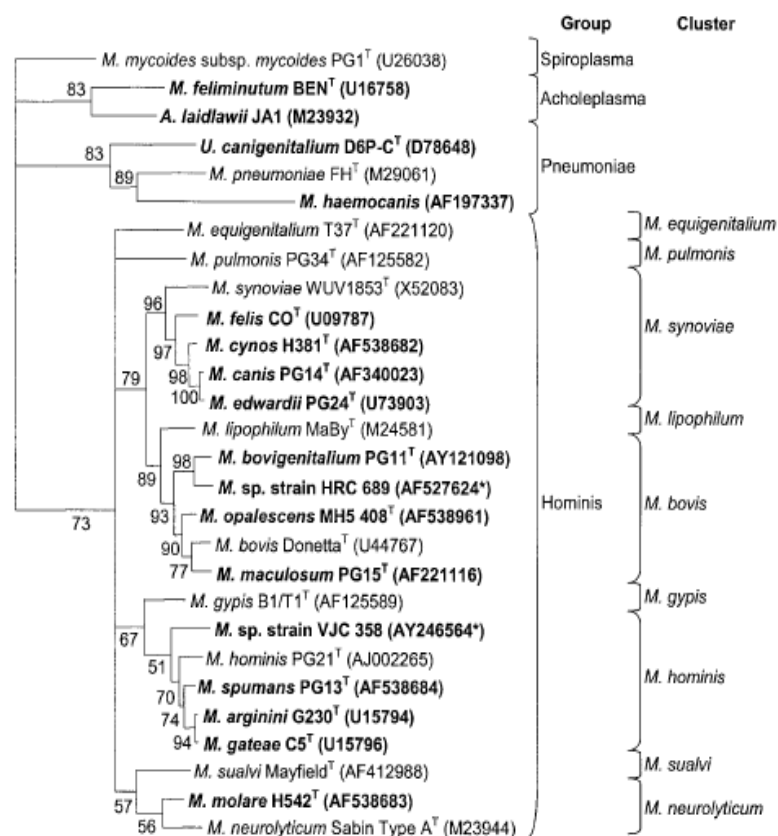
Pri poškodbi gostiteljskih celic pa so prav tako pomembne proteaze, hemolizin, nevraminidaze in pri *M. alligatoris* tudi hialuronidaza (Brown in sod., 2004).

Za preživetje mikoplazem znotraj gostitelja je izmikanje imunskemu sistemu zelo pomembno. Mehanizma, ki preprečita učinkovit imunski odziv gostitelja sta molekularna mimikrija in fenotipska variabilnost. Fenotipska variabilnost je pri mikroorganizmih posledica antigenske spremenljivosti. Mikroorganizmi spreminjajo površinske komponente z visoko frekvenco. S spreminjanjem antigenskega repertoarja na površini in posledično imunogenosti se mikoplazme uspešno izmikajo imunskemu odzivu. Ker nimajo celične stene, gibalnih organelov ali bičkov, so glavne spreminjajoče površinske molekule lipoproteini (Rottem, 2003). Ko govorimo o molekularni mimikriji imamo v mislih predvsem antigenske epitope ki so skupni nekaterim mikoplazmam in gostiteljskim celicam. Ti antigenski epitopi naj bi bili vpleteni v izmikanje imunskemu sistemu in/ali nastanek avtoimunskih protiteles med okužbo. Molekularna mimikrija patogenu olajša okužbo, saj imunski sistem patogena ne prepozna takoj ob vstopu in je zato imunski odziv zakasnel (Cahill in sod., 1971). Ko imunski sistem gostitelja odgovori na takšne antigenske epitope (mikrobni antigen), nastala protitelesa navzkrižno reagirajo tudi z enakimi lastnimi antigenskimi determinantami in tako se sproži avtoimunski odziv (Rottem, 2003).

2.3 MIKOPLAZME PRI PSIH

Leta 1975 je Rosendal predlagal, da bi se izraz pasje mikoplazme (»canine mycoplasma«) uporabljal le za tiste vrste *Mycoplasma*, ki so bile izolirane izključno iz psov oziroma pogosto izolirane iz psov in le redko iz ostalih gostiteljev (Rosendal, 1975). Vendar pa ob upoštevanju tako stroge omejitve ne bi bilo možno opisati dejanske mikoplazemske flore psov. V zadnjih 70 letih je bilo pri psih izoliranih oziroma dokazanih 15 znanih vrst mikoplazem in dve vrsti, ki še nista popolnoma opisani: *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma canis*, *Mycoplasma cynos*, *Mycoplasma edwardii*, *Mycoplasma feliminutum*, *Mycoplasma felis*, *Mycoplasma gateae*, *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma maculosum*, *Mycoplasma molare*, *Mycoplasma opalescens*, *Mycoplasma spumans*, *Mycoplasma* sp. HRC689, *Mycoplasma* VJC358 ter *Acholeplasma laidlawii* in *Ureaplasma canigenitalium* (Chalker, 2005).

Na sliki 1 vidimo, da je večina vrst *Mycoplasma* uvrščenih v filogenetsko skupino Hominis, razen *M. haemocanis* in *M. feliminutum*. *M. haemocanis* in *U. canigenitalium* sta uvrščeni v skupino Pneumoniae, *A. laidawii* in *M. feliminutum* pa v rod *Acholeplasma* (Chalker, 2005).



Slika 1: Filogenetsko drevo, izrisano na podlagi 16S rRNA analiz, s štirimi od petih skupin ter z vsemi gručami znotraj skupine Hominis (Chalker in Brownlie, 2004: 540).

Zaradi težav pri identifikaciji pasjih mikoplazem se večina študij ukvarja le z ugotavljanjem prisotnosti ali odsotnosti mikoplazem v kliničnih vzorcih in je zelo malo znanega o okužbah in boleznih, ki jih povzročajo vrste *Mycoplasma*. Prav tako še ničesar ni znanega o pritrjanju mikoplazem na gostiteljska tkiva, o specifičnosti za gostitelja ter načinu prenosa med gostitelji (Chalker, 2005).

Pri vseh psih so našli mikoplazme v zgornjem respiratornem traktu, zato predvidevajo, da so del normalne bakterijske flore. Le 20-25 % zdravih psov ima mikoplazme tudi v trahejah in pljučih, medtem ko ima kar 78 % psov s pljučnimi boleznimi mikoplazme v pljučih (Randolph in sod., 1993). Pri tretjini psov so mikoplazme del normalne črevesne flore debelega črevesja, ni pa še znano, ali povzročajo tudi vnetje (Bowe in sod., 1982).

Mycoplasma haemocanis s pritrjanjem in rastjo na eritrocitih pri psih povzroča anemijo (Messick in sod., 2002).

2.3.1 *Mycoplasma canis*

Uvrščena je v skupino Hominis in gručo *M. synoviae*. Izolirali so jo iz psov z urogenitalnimi okužbami in neplodnostjo, vendar še ni znano ali je povzročitelj teh bolezni (L'Abee-Lund in sod., 2003). Pri poskusnih okužbah z *M. canis* so pri psih odkrili uretritis in vnetje epididimisa ter pri 50 % psic povečano maternico in endometritis-vnetje maternične sluznice (Rosendal, 1982).

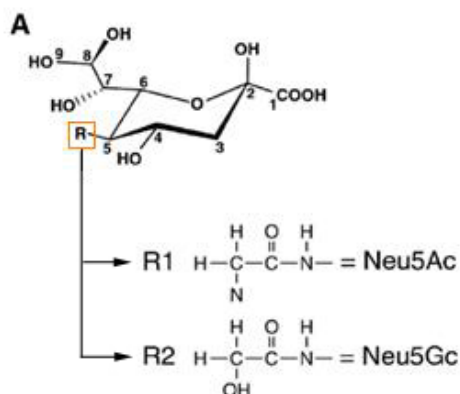
Tako kot nekatere druge mikoplazme, tudi *M. canis* nima samo enega gostitelja. Izolirali so jo tudi iz zdravega goveda in goveda z respiratornimi boleznimi (Thomas in sod., 2002; Nicholas in sod., 1995; ter Laak in sod., 1993) ter iz človeka z respiratornim obolenjem (Armstrong in sod., 1971). Tipski sev *M. canis* PG14 sta leta 1951 izolirala Edward in Fitzgerald (Edwards in Fitzgerald, 1951). Velikost genoma *M. canis* je približno 795 kbp, delež GC baznih parov pa 28,4-29,1 % (Chalker, 2005). *M. canis* lahko veže eritrocite (hemaglutinacija oz. hemadsorbicija) in ima spremenljivo proteolitično aktivnost (razgradnja želatine) (Gardella in DelGuidice, 1983). *M. canis* fermentira glukozo in reducira tetrazolijeve soli v aerobnih in anaerobnih pogojih. Ne hidrolizira arginina. Pri razgradnji maltoze, glikogena, dekstrina in škroba tvori kisline. Te pa ne nastajajo pri razgradnji manoze, saharoze in galaktoze (Bergey's... , 1994). Vsi preučevani sevi *M. canis* oksidirajo glicerol (Megid in sod., 2001). Hitrost reakcije je velika in afiniteta do substrata prav tako. Pri glicerol oksidirajočih mikoplazmah je glicerol najprej fosforiliran do L- α -glicerofosfata, ki ga L- α -glicerofosfat oksidaza oksidira do trioze fosfata. Pri tem se porabi en mol kisika in nastane en mol vodikovega peroksida, ki je eden izmed virulenčnih faktorjev (Taylor in sod., 1996; Miles in sod., 1991).

2.4 SIALIČNA KISLINA

Površina mnogih celic, tako prokariontskih kot evkariontskih, je pokrita s sialokonjugati, ki imajo pomembno vlogo v mnogih bioloških procesih. Sodelujejo pri prepoznavanju celic med seboj ter prepoznavanju majhnih molekul in celic (Severi in sod., 2007). Sialična oz. nevraminska kislina je hidrofilna molekula in ima negativni naboj. Pri evkariontih sialična kislina regulira delovanje transmembranskih receptorjev - sodeluje npr. pri pritrjanju virusov in mikoplazem na gostiteljske celice, zaradi negativnega naboja sodeluje pri vezavi in transportu pozitivno nabitih molekul, privlačijo oziroma odbijajo celice in molekule, poleg tega pa so tudi sporočilne molekule, ki sodelujejo pri regulaciji med celicami (Schauer, 2000; Feizi in Childs, 1985). Pri evkariontskih celicah je sialična kislina prisotna tudi v znotrajceličnih membranah (npr. Golgijevem aparatu). Pri višjih organizmih je pomembna komponenta seruma in sluznic (Traving in Schauer, 1998). Torej sialična kislina ni le zelo zanimiva molekula, temveč tudi zelo pomembna v bioloških procesih (Vimr, 1994).

2.4.1 Struktura sialične kisline

Sialična kislina (nevraminska kislina) je generično ime, ki se uporablja za družino več kot 40 sorodnih kislih keto sladkorjev iz devetih atomov ogljika. Vse te spojine nastanejo iz 2 – keto – 3 – deoksi - 5- acetamido – D – glicero – D - galakto nonulosonske kisline. Sialične kisline in nonulosonati so edini sladkorji z devetimi ogljikovi atomi, ki jih lahko najdemo pri prokariontih (Vimr in sod., 2004). V naravi se najpogosteje pojavljata N - acetilnevraminska kislina in N - glikolilnevraminska kislina, ki se med seboj razlikujeta le na poziciji 5 (C-5) ogljikovega obroča (slika 2).



Slika 2: Struktura N-acetilnevraminske kisline (Neu5Ac) in N-glikolilnevraminske kisline (Neu5Gc) (Vimr in sod., 2004: 133).

Kljub temu, da je N - glikolilnevraminska kislina druga najpogostejša sialična kislina večine vretenčarjev (sesalcev, ptic, dvoživk, plazilcev in rib), je v bakterijah doslej niso našli (Vimr in sod., 2004).

Pri različnih organizmih je sialična kislina različno modificirana. Poleg modifikacij z N - acetil in N - glikolil na petem mestu sladkornega obroča je možna tudi acetilacija hidroksilnih skupin na mestih C4, C7, C8 in C9. Čeprav nekoliko manj običajne, so možne tudi modifikacije z laktil, sulfhidril in metil skupinami. Sialična kislina je lahko vezana na sladkorje (oligosaharide in polisaharide), običajno pa je del glikolipidov in glikoproteinov, ki jih s skupnim imenom poimenujemo sialoglikokonjugati (Vimr in sod., 2004).

Organizmi, združeni v naddeblo Deuterostomia (vretenčarji, kozolnjaki in iglokožci), imajo štiri glavne tipe glikokonjugatov: glikozilfosfatidilinozitolna sidra, glikoproteine, glikolipide in proteoglikane. Sialična kislina je največkrat terminalni del glikoproteinov in glikolipidov. Glikokonjugati bakterij so kapsularni polisaharidi (K - antigeni), lipopolisaharidi (O - antigeni), glikoproteini S - sloja in peptidoglikani. Sialična kislina je največkrat del kapsularnih polisaharidov in lipopolisaharidov, vendar pa se ne nahaja na terminalnem delu (Angata in Varki, 2002).

2.4.2 Vloga sialične kisline v patogenezi

Patogene bakterije sialično kislino uporabljajo v različne namene. Pomembna je pri kolonizaciji gostitelja, obstanku patogenega mikroorganizma v gostitelju ter povzročanju bolezni (Severi in sod., 2007). Sialokonjugati so prevladujoče komponente celičnih površin sesalcev, zato vključitev sialične kisline v lipopolisaharide ali kapsule patogenemu mikroorganizmu omogoča izmikanje oziroma nasprotovanje gostiteljskemu imunskemu sistemu (Harvey in sod., 2001). Nekatere patogene bakterije (kot npr. *Escherichia coli* in *Haemophilus influenzae*) sialično kislino gostiteljev uporabljajo kot vir ogljika in dušika (Vimr in sod., 2004; Severi in sod., 2005). N - acetilnevraminat aldolaza N - acetilnevraminsko kislino cepi v N - acetilmanozamin in piruvat. N - acetilmanozamin bakterija nato pretvori v amonijak in fruktozo-6-fosfat, ki vstopi v centralni metabolizem (Vimr in sod., 2004). Kako bakterija vzdržuje ravnotežje med kataboličnimi in anaboličnimi potmi, ni znano, so pa pri *H. influenzae* našli dokaze tekmovanja za sialično kislino med katabolično potjo in sialilacijo lipopolisaharidov (Vimr in sod., 2000).

Sialične kisline patogeni mikroorganizmi ne uporabljajo le za izmikanje imunskemu sistemu gostitelja. Že dolgo je znano, da se nekatere vrste mikoplazem vežejo na sialoglikokonjugate gostiteljskih celic in jih uporabijo kot receptorje za vezavo. Glikoproteini eritrocitov, na katere se veže *M. pneumnoniae*, imajo terminalno sekvenco N-acetilnevraminska kislina (α 2-3) galaktoza (β 1-4) N - acetilglukozamin (Roberts in sod., 1989). Veže se tudi na glikoproteine brez sialične kisline in sulfatirane glikolipide (Geary in sod., 1990; Krivan in sod., 1989).

2.4.3 Načini pridobivanja sialične kisline

Bakterije sialično kislino lahko pridobijo na dva načina: *z de novo* biosintezo ali iz okolja (Vimr in Lichtensteiger, 2002; Vimr in sod., 2004).

Biosintezo *de novo* uporabljajo številne bakterije, med katerimi so tudi *E. coli* K1, *Neisseria meningitidis* in *Campylobacter jejuni*. Prekurzor za sintezo sialične kisline je

UDP N-acetilglukozamin, ki ga sintetizira večina bakterij, saj ga potrebujejo za sintezo celične stene. Encim UDP N-acetilglukozamin 2 - epimeraza pretvori prekursor v N - acetilmanozamin, ki se v reakciji kondenzacije s fosfoenolpiruvatom pretvori v N - acetilnevraminsko kislino. Reakcijo katalizira sintaza N - acetilnevraminske kisline. Po končani sintezi sintetaza aktivira sialično kislino v citidinmonofosfat (CMP) – N - acetilnevraminsko kislino. Šele nato se lahko sialična kislina veže na znotrajcelično sialil transferazo, ki jo prenese na ustrezno komponento površine patogene bakterije (Vimr in sod., 2004).

Drugi vir sialične kisline je gostitelj. Mnoge patogene bakterije izločajo sialidaze, ki odcepljajo sialične kisline iz gostiteljskih sialokonjugatov (Corfield, 1992). Nekatere bakterije (kot npr. *H. influenzae*) pa kljub temu, da ne sintetizirajo sialidaze lahko izkoriščajo sialično kislino gostitelja (Bouchet in sod., 2003). Najverjetneje je sialična kislina tem patogenim bakterijam dostopna zaradi delovanja sialidaz drugih bakterij ali sialidaz gostitelja, ki so navadno prisotne med vnetjem (Shakhnovich in sod., 2002; Sohanpal in sod., 2004). Sproščena sialična kislina se preko transporterjev prenese v citoplazmo, kjer jo bakterije aktivirajo, sialiltransferaza jo prenese na LPS, celoten kompleks pa se nato preko membrane prenese na površino celic. Transport sialične kisline poteka s specifičnimi transporterji (Severi in sod., 2007). Izjema je *Neisseria gonorrhoeae*, ki izkorišča gostiteljevo CMP – N - acetilnevraminsko kislino. Bakterija ima na membrano vezano zunajcelično sialiltransferazo, zato transport v celico ni potreben (Shell in sod., 2002).

Pri *Trypanosoma cruzi* so odkrili prav poseben mehanizem sialilacije, v katerem ne sodelujeta aktivirana sialična kislina in sialiltransferaza. Tripanosoma ne sintetizira sialične kisline, niti je ne razgrajuje. Ima zapis za sialidazo, ki jo uporablja pri sialilaciji površine s trans - sialidaznim mehanizmom (Previato in sod., 1985). Na površino celice vezana sialidaza odstrani sialično kislino iz membrane evkariontskih celic ter jo prenese na galaktozil akceptorje na svoji površini (transglikozilacija). Sialiltransferazna aktivnost sialidaze je večja od hidrolitične aktivnosti, vse dokler so prisotni ustrezni galaktozil akceptorji (Vimr in Lichtensteiger, 2002; Previato in sod., 1985).

2.5 NEVRAMINIDAZA

Nevraminidaza (sialidaza, N - acilnevraminozil glikohidrolaza) je eksoglukozidaza, ki hidrolizira z α - glikozidno vezjo vezano sialično kislino. Sialična kislina je vezana na glikoproteine, glikolipide in oligosaharide (Roggentin in sod., 1993). Encim je prisoten pri organizmih naddebla *Deuterostomia* ter nekaterih mikroorganizmih - najpogosteje tistih, ki večino svojega življenja preživijo kot komenzali ali fakultativni patogeni. Med mikroorganizmi je nevraminidaza prisotna pri nekaterih glivah, protozoidih, bakterijah in virusih. Rastline in ostali večcelični organizmi nimajo niti nevraminidaze niti substratov, specifičnih za nevraminidaze (Roggentin in sod., 1993).

2.5.1 Geni za nevraminidaze

Zapis za sintezo nevraminidaze se pri večini mikroorganizmov nahaja v genih *nan*. Genske sekvence bakterijskih nevraminidaz so različnih dolžin in podobnost med njimi je majhna. Kljub temu sta jim skupna dva motiva. Prvi motiv je »FRIP« motiv (Phe-Arg-Ile-Pro), ki leži pred drugim motivom, »Asp škatlo« (Ser/Thr-X-Asp-X-Gly-X-Thr-Trp/Phe), ki se v sekvenci ponovi 3-5 - krat (Roggentin in sod., 1989).

Raziskave kažejo, da so geni, ki nosijo zapis za nevraminidazo med mikroorganizmi, zelo neenakomerno porazdeljeni. Tako se ozko sorodne vrste ali celo sevi iste vrste razlikujejo glede prisotnosti tega gena in zmožnosti sinteze nevraminidaze. Ravno zato sinteza nevraminidaze najverjetneje ni esencialna za preživetje mikroorganizmov, predstavlja pa prednost pri pridobivanju hranil (Grobe in sod., 1998). Pri patogenih mikroorganizmih nevraminidaza mikroorganizmom služi tudi kot kolonizacijski in virulenčni faktor (Corfield, 1992).

2.5.2 Substrati

Substrat za nevraminidazo je navadno terminalno vezana sialična kislina sialoglikokonjugatov, ki se nahajajo v gostiteljih. Pri organizmih naddebla *Deuterostomia* je navadno sialična kislina vezana z α (2-3) ali α (2-6) glikozidno vezjo na oligosaharide,

glikoproteine in glikolipide, α (2-8) vezi pa so prisotne pri gangliozidih in glikoproteinih. Večina bakterijskih nevraminidaz preferenčno cepi sialično kislino, ki je na glikokonjugate vezana z α (2-3) vezjo. Zanimivo je, da nevraminidaze z nizko molekulsko maso (*Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii* in *Salmonella typhimurium*) hidrolizirajo le omejeno število substratov in imajo veliko preferenco za cepljenje α (2-3) vezi, medtem ko encimi z večjo molekulsko maso cepijo večino naravnih substratov (Roggentin in sod., 1993).

2.5.3 Tipi in molekulske mase nevraminidaz

Mnogi mikroorganizmi nevraminidazo izločajo v gojišče, pri nekaterih je vezana na membrano (npr. pri *Actinomyces viscosus*) ali je intracelularna (npr. pri *Salmonella typhimurium*). Večina nevraminidaz je monomernih, izjemi sta nevraminidazi *Clostridium chauvoei* (dimer) in *Clostridium septicum* (trimer) (Roggentin in sod., 1993).

Molekulske mase nevraminidaz se med seboj zelo razlikujejo in so med 40 kDa in 125 kDa (Abrashev in Dulguerova, 2000). Nekateri mikroorganizmi sintetizirajo tudi nevraminidaze z veliko večjimi molekulskimi masami. *Clostridium chauvoei* sintetizira nevraminidazo z molekulsko maso 300 kDa, nevraminidaza bakterije *Pasteurella multocida* ima maso 250 kDa (Heuermann in sod., 1991; Scharmann in sod., 1970).

2.5.4 Optimalni pH in temperatura

Optimalni pH delovanja bakterijskih nevraminidaz je med 5 in 7. Temperaturni optimum večine nevraminidaz je 35-40 °C (Abrashev in Dulguerova, 2000). Nevraminidazi *Arthrobacter ureafaciens* in *Micromonospora viridifaciens* imata največjo aktivnost pri 50-58 °C (Uchida in sod., 1979; Aisaka in sod., 1991).

2.5.5 Vloga nevraminidaze v patogenezi

Medtem ko je vloga virusne nevraminidaze v patogenezi influence dobro poznana pa osrednja vloga nevraminidaz pri bakterijah ni tako jasno določena. Nevraminidaza virusov

prepreči vezavo hemaglutinina in sialične kisline receptorja za hemaglutinin ter tako prepreči agregacijo virusov in omogoči širjenje virusa (Colman, 1994; Soong in sod., 2006). Ker je veliko mikroorganizmov, ki sintetizirajo nevraminidazo patogenih, predvidevajo, da je encim pomemben virulenčni dejavnik (Gabriel in sod., 1984, cit. po Abrashev in Dulguerova, 2000) ali faktor, ki omogoča širjenje mikroorganizma v gostitelju (Ezepchuk in sod., 1974, cit. po Abrashev in Dulguerova, 2000). Nevraminidaze spremenijo strukturo celične membrane in posledično se spremeni fiziologija celic in aktivni transport kationov. Te spremembe vodijo do povečane fagocitoze, indukcije hemaglutinacije in zmanjšanja agregacije celic (Weiss in sod., 1969, cit. po Abrashev in Dulguerova, 2000; Gesner in Thomas, 1966, cit. po Abrashev in Dulguerova, 2000; Kemp, 1986, cit. po Abrashev in Dulguerova, 2000).

Nevraminidaza ima pomembno vlogo pri razgradnji polimerov. Sialilirani oligosaharidi, glikoproteini, glikolipidi in gangliozidi so zaščiteni pred hidrolizo, po odcepitvi sialične kisline pa postanejo tarča za razgradnjo z različnimi encimi. Zaradi depolimerizacije zunajceličnega matriksa ta ne opravlja več funkcije rezervoarja citokinov in encimov vpletenih v signalno transdukcijo (Ernst in sod., 1995). Permeabilnost vezivnega tkiva se poveča in zmanjša se viskoznost telesnih tekočin, kar omogoča lažje širjenje bakterij in tesnejši kontakt z gostiteljskimi celicami (Ponnuraj in Jedrzejcas, 2000). Z depolimerizacijo zunajceličnega matriksa bakterije pridobijo tudi hranila (Matsushita in Okabe, 2001; Roggentin in sod., 1988). Nevraminidaze naj bi bile vpletene v avtoimunski odziv, ki nastane med okužbo. Zaradi desializacije gostiteljskih glikokonjugatov se tvorijo novi antigeni, ki jih gostiteljev imunski sistem prepozna kot tujek (Biberfeld, 1979; Kahane in sod., 1990).

2.5.6 Nevraminidaze pri mikoplazmah

Nevraminidazna aktivnost je pri mikoplazmah redka. Doslej so jo potrdili v skupini Hominis pri *M. alligatoris*, ki je patogen aligatorjev (Brown in sod., 2004) ter *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis*, *M. iowae* in *M. corogypsi*, ki so ptičje vrste mikoplazem (Berčič in sod., 2008; May in Brown, 2008). V gruči *M. synoviae* imajo visoko nevraminidazno aktivnost vrste *M. alligatoris*, *M. corogypsi* in *M. canis*.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 GOJENJE BAKTERIJSKE KULTURE

Kultura, ki smo jo uporabili, izvira iz vaginalnega brisa psice z reproduktivnimi motnjami. Uporabljali smo 5-10 pasažo kulture, gojene v laboratoriju.

Bakterijsko kulturo *M. canis* smo gojili v dveh modificiranih Frey-evih medijih. Gojili smo jo v modificiranem Frey-evem mediju, ki je vseboval 10 % prašičjega seruma, 0,1 % nikotinamid adenin dinukleotida (NAD) in 0,1 % cistein hidroklorida ter v modificiranem Frey-evem mediju z 10 % konjskim serumom brez NAD. Različna seruma naj ne bi vplivala na rast kulture, zato smo uporabili tistega, ki je bil trenutno na voljo. Kulturo smo inkubirali pri 37-38 °C do pozne logaritemske faze rasti (Berčič in sod., 2008) in nato pripravili vzorce za testiranje nevraminidazne aktivnosti, kot je to opisano v nadaljevanju. Število enot, ki tvorijo kolonije (colony forming units, CFU) smo določili po standardnem postopku (Rodwell in Whitcomb, 1983).

3.2 PRIPRAVA VZORCEV ZA TESTIRANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI

3.2.1 Priprava supernatanta in suspenzije celic

Tekočo kulturo *M. canis* smo centrifugirali v centrifugi RC5C Sorvall Instruments, Du Pont (rotor GSA) 20 min pri 12000 obr./min. Supernatant smo odstranili ter ga shranili, usedlino celic pa resuspendirali v tolikšnem volumnu fosfatnega pufra (pH 7,2), da smo celice skoncentrirali za faktor 1000 glede na volumen kulture v bujonu. Supernatant (vzorec S) in resuspendirane celice (vzorec RC) smo hranili na -20 °C. Tako skoncentrirane celice iz različnih kultur smo uporabljali kot izhodne vzorce, iz katerih smo pripravili vse rečitve, ki smo jih testirali.

3.2.2 Priprava membranske frakcije in frakcije s citoplazemsko vsebino

Te vzorce smo pripravili s postopkom osmotske lize in cikli zamrzovanja in odmrzovanja. Membrane celic *M. canis* smo izolirali tako, da smo 50 µl skoncentriranih celic (vzorec RC, točka 3.2.1) dodali 950 µl dvojno destilirane vode. Vzorec smo zamrznili na -85 °C, nato pa segreli na 37 °C. Postopek smo ponovili trikrat. Po končani lizi smo vzorec centrifugirali v ultracentrifugi Beckman (rotor TLA 100), 30 min pri 30000 obr./min. Supernatant smo ločili od usedline ter ga shranili (frakcija s citoplazemsko vsebino, vzorec CF), usedlino (membransko frakcijo, vzorec M) pa smo resuspendirali v 50 µl fosfatnega pufra (pH 7,2). Tako pripravljene vzorce smo shranili na -20 °C.

Zaradi primerjave aktivnosti vzorcev CF in M, smo pred uporabo vzorce M še dodatno redčili (npr. 1,5 µl vzorca in 28,5 µl fosfatnega pufra), da smo dobili enako redčitev kot je bila v vzorcu CF in sicer 1 : 20.

Za kontrolo smo prav tako uporabili vzorec suspendiranih celic (vzorec RC), le da smo mu namesto dvojno destilirane vode dodali enak volumen fosfatnega pufra. Ta vzorec nam je služil za primerjavo motnosti. Lizo celic namreč lahko zaznamo kot zbistritev vzorca.

3.3 DOLOČANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI

Z merjenjem nevraminidazne aktivnosti smo preverjali prisotnost nevraminidaze v vzorcih: S (gojitveni medij oz. supernatant), RC (skoncentrirane celice), M (membranska frakcija) ter CF (citoplazemska vsebina celic).

Poleg preverjanja nevraminidazne aktivnost posameznih vzorcev, smo preverjali tudi nevraminidazno aktivnost v odvisnosti od starosti kulture in sicer z merjenjem aktivnosti resuspendiranih celic.

Za preverjanje nevraminidazne aktivnosti smo najprej preizkusili delovanje in primernost dveh testov, ki se razlikujeta v uporabljenem substratu. Uporabili smo fluorogen in kromogen substrat.

3.3.1 Določanje nevraminidazne aktivnosti s fluorogenim substratom

Potier in sodelavci so leta 1979 razvili občutljiv test za ugotavljanje nevraminidazne aktivnosti z uporabo 2'-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilnevraminske kisline (MUAN, M8639, Sigma) kot substrata za encim. V reakciji hidrolize, ki jo katalizira nevraminidaza, nastaneta N-acetilnevraminska kislina in 4-metilumbeliferon. Encimsko aktivnost merimo s pomočjo fluorescence 4-metilumbeliferona pri 450 nm. Intenziteta fluorescence je premosorazmerna encimski aktivnosti. Maksimum vzbujevalne svetlobe je 315-374 nm, fluorescentne svetlobe pa 365-450 nm (Potier in sod., 1979).

3.3.2 Določanje nevraminidazne aktivnosti s kromogenim substratom

Kromogeni substrat je bila natrijeva sol 5-bromo-4-kloro-3-indolil- α -D-N-acetilnevraminske kisline (BIN, B4666, Sigma). Pri pozitivni reakciji nastane modro obarvan, netopen produkt, ko po cepitvi terminalne N-acetilnevraminske kisline pride do oksidacije indola.

Delovne raztopine substrata (1 mg substrata na mililiter dvojno destilirane vode), smo pripravili z redčenjem založne koncentracije (4 mg substrata na mililiter dvojno destilirane vode), ki smo jo hranili v obliki alikvotov (1 ml) pri -20 °C.

Poskuse smo opravljali v mikrocentrifugirkah ali mikrotiterskih ploščah. Vzorce smo razredčili z dvojnimi redčitvami. V določeno število luknjic smo nanесли 30 μ l fosfatnega pufru ter v prvo luknjico tudi 30 μ l vzorca s celicami *M. canis* ter dobro resuspendirali. Iz prve luknjice smo 30 μ l vzorca prenesli v drugo luknjico ter iz druge luknjice v tretjo luknjico in postopek ponavljali vse do konca redčitvene vrste. V vsako luknjico smo nato dodali še 5 μ l substrata. Vzorce smo inkubirali na sobni temperaturi ter spremljali nevraminidazno aktivnost v časovnem intervalu ene ure. Pozitivna reakcija se je pojavila, ko je brezbarvna raztopina postala modre barve.

V vseh poskusih ugotavljanja nevraminidazne aktivnosti smo kot pozitivno kontrolo uporabili nevraminidazo *Clostridium perfringens* (N2876, Sigma) ter PBS kot negativno

kontrolno. Pozitivno in negativno kontrolno smo pripravili na enak način kot vzorce, katere smo želeli testirati, le da nismo pripravili celotne redčitvene vrste temveč le redčitev 1 : 2.

Močno pozitivne reakcije smo označili z ++, šibko pozitivne reakcije z +, negativne reakcije pa z -.

3.4 PREVERJANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI CELIC *M. canis* VEZANIH NA MEMBRANO

Zaradi težav pri preverjanju nevraminidazne aktivnosti po prenosu proteinov na membrano, smo želeli preveriti ali vezava celic na membrano ter blokiranje membrane vplivata na nevraminidazno aktivnost celic *M. canis*.

Iz membrane smo izrezali dva 5 cm dolga in 1 cm široka trakova ter nanju narisali 1 cm² velike kvadratke. Trakova smo namočili v 100 % metanolu za 1-2 sekundi, da smo aktivirali membrano. Nato smo ju sprali z destilirano vodo. Na vsak kvadrateg smo nanesti 3 µl suspenzije celic *M. canis*. Po nanosu vzorcev smo počakali, da so se posušili. Ko so se posušili smo en trak membrane blokirali v 0,5 % Tween PBS (30 min) ter pustili, da se je posušil. Drugega traku membrane nismo blokirali.

Preko vzorcev smo nanesti še 3 µl substrata in spremljali pojav modre barve.

3.5 TEMPERATURA INAKTIVACIJE NEVRAMINIDAZE

Temperaturo, pri kateri nevraminidaza izgubi svojo aktivnost, smo določili z enourno inkubacijo celične suspenzije na 45 °C, 50 °C in 55 °C.

Iz suspenzije celic in fosfatnega pufr (pH 7,2) smo pripravili redčitev 1 : 2 ter tako pripravljene vzorce inkubirali na temperaturah 45 °C, 50 °C in 55 °C eno uro. Za kontrolno nam je služil enak vzorec inkubiran na sobni temperaturi.

Po končani inkubaciji smo vzorce ohladili na sobno temperaturo ter 30 μl vzorca dodali 5 μl BIN-a. Razvoj modre barve je pomenil, da temperatura, pri kateri smo inkubirali vzorec, ni bila dovolj visoka za inaktivacijo encima.

3.6 DOLOČANJE pH OPTIMUMA REAKCIJE IN VPLIVA KALCIJEVIH IONOV

Iz izhodnega vzorca suspenzije celic (vzorec RC) smo v mikrocentrifugirkah pripravili 16 vzorcev z redčitvijo 1 : 4. V mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 6 μl vzorca ter 24 μl PBS (pH 7,2).

Vzorce smo centrifugirali (Eppendorf centrifuge 5417C) pri 10000 g, 10 min. Supernatant smo nato odstranili, usedlino celic pa resuspendirali v pufru z ustreznim pH. Uporabili smo fosfatni pufer z oz. brez CaCl_2 ter pH=3-10. Tako smo dobili dve pH vrsti, eno vrsto s fosfatnim pufrom z CaCl_2 in pH od 3 do 10 ter drugo s fosfatnim pufrom brez CaCl_2 in pH od 3 do 10.

Naša kontrola je bil vzorec celic *M. canis*, redčen 1:4 v PBS (pH 7,2).

Vsem vzorcem smo dodali 5 μl BIN-a ter glede na čas pojava pozitivne reakcije, določili optimalen pH delovanja nevraminidaze. Močno pozitivne reakcije smo označili z ++, šibko pozitivne reakcije z + ter negativne z -.

3.7 SDS POLIAKRILAMIDNA ELEKTROFOREZA (SDS-PAGE)

3.7.1 Elektroforeza

S postopkom elektroforeze smo v gelu ločili proteine celic glede na molekulsko maso. Uporabili smo poliakrilamidno elektroforezo z natrijevim dodecil sulfatom (NaDS), s katero ločujemo proteine glede na njihovo molekulsko maso. Elektroforeza je potekala na

poliakrilamidnih nosilcih z ustrezno zamreženostjo, ki smo jo izbrali glede na velikost molekul, ki smo jih želeli ločiti med seboj.

3.7.1.1 Priprava vzorcev

Kot vzorec smo uporabili suspenzijo celic (vzorec RC). Vzorec za nanos na elektroforezo smo pripravili tako, da smo vzorcu RC dodali tolikšen volumen 5 % SDS, da je bila končna redčina vzorca 1 : 10 ter 1 : 20.

Za nanos na elektroforezo smo obe rečitvi vzorca (tako 1 : 10 kot tudi 1 : 20) pripravili z reducirajočim nanašalnim pufrom (nanašalni pufer s 5 % β -merkaptetanolom) in nereducirajočim pufrom (s 5 % PBS). Volumsko razmerje med vzorcem in nanašalnim pufrom je bilo 3 : 2. Na gel smo nanесли 60 μ l vzorca.

1 ml reducirajočega nanašalnega pufera smo pripravili iz 950 μ l nanašalnega pufera in 50 μ l β -merkaptetanola. V nereducirajočem nanašalnem pufri smo β -merkaptetanol nadomestili s 50 μ l PBS.

Preglednica 3: Koncentracije in sestava štirih različnih vzorcev za nanos na elektroforezo pripravljenih iz suspenzije celic *M. canis*.

redčitev vzorca za nanos	5 % SDS	reducirajoči nanašalni pufer z β - merkaptetanolom	nereducirajoči nanašalni pufer s PBS
1 : 10	+	-	+
1 : 10	+	+	-
1 : 20	+	-	+
1 : 20	+	+	-

3.7.1.2 Referenčni markerji

Referenčne markerje smo potrebovali za določitev molekulske mase proteinov, ki smo jih ločevali ter jim želeli določiti velikost. Uporabili smo mešanico desetih rekombinantnih, dobro očiščenih in obarvanih proteinov z molekulskimi masami 170 kDa, 130 kDa, 95

kDa, 72 kDa, 56 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 26 kDa, 17 kDa in 11 kDa (Fermentas, Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, SM0671). V eno stezo gela smo nanegli 10 µl mešanice referenčnih markerjev.

3.7.1.3 Pogoji in potek elektroforeze

Proteine smo ločevali v poliakrilamidnem gelu, pri čemer je bil nanašalni gel 4 %, ločevalni gel pa 8 %. Med plošči smo najprej vlili ločevalni gel ter ga prekrili z 1 ml z vodo nasičenega n-butanola (volumsko razmerje butanol : voda je 1 : 1). Ko se je gel strdil, smo odlili butanol ter površino gela, ki je bila v stiku z butanolom dobro sprali z destilirano vodo. Gel smo osušili tako, da smo preostanek vode popivnali s filter papirjem. Na strjeni ločevalni gel smo vlili 4 % nanašalni gel ter namestili glavnik, še preden se je gel strdil.

Preglednica 4: Kemikalije za pripravo 8 % ločevalnega gela.

8 % ločevalni gel	7,5 mL
H ₂ O	3,4 mL
30 % akrilamid/bis-akrilamid	2 mL
1.5 M Tris (pH 8,8)	2 mL
10 % SDS	75 µL
10 % APS	75 µL
TEMED	3 µL

Preglednica 5: Kemikalije za pripravo 4 % nanašalnega gela.

4 % nanašalni gel	4 mL
H ₂ O	2,2 mL
30 % akrilamid/bis-akrilamid	670 µL
0.5 M Tris (pH 6,8)	1 mL
10 % SDS	40 µL
10 % APS	40 µL
TEMED	4 µL

Velikost ločevalnega gela je bila 7,3 cm x 8,5 cm. Ločevanje molekul je s pomočjo elektroforetskega pufra (250 mM Tris-glicinat z 0,1 % SDS in pH 8,3) potekalo v nanašalnem gelu pri 100 mA in 80 V približno pol ure ter v ločevalnem gelu pri 100 mA in 120 V približno 4 ure.

3.7.2 Barvanje gela

Da smo preverili, ali smo nanesti prave koncentracije vzorcev na gel in ali so se proteini dovolj dobro ločili, smo gel pobarvali. Gel smo barvali v barvilu za barvanje gela, kateremu smo tik pred uporabo dodali še očetno kislino do končne koncentracije 10 %. Barvilo za barvanje gela smo pripravili tako, da smo mešanici 125 ml metanola in 125 ml destilirane vode dodali 0,25 g Coomassie Brilliant Blue barvila s koncentracijo 1,1 mg/ml (B0149, Sigma). Gel smo barvali toliko časa, da je popolnoma pomodrel, nato pa smo ga razbarvali. Uporabili smo raztopino za razbarvanje (metanol in destilirana voda v razmerju 1 : 17,5), kateri smo pred uporabo dodali očetno kislino do končne koncentracije 7,5 %.

3.7.3 Mini SDS elektroforeza

Ker s klasično elektroforezo nismo uspeli identificirati encima na membrani, smo izvedli še mini SDS elektroforezo. Elektroforezo smo izvedli z aparatom PhastSystem™ (Pharmacia) po navodilih proizvajalca in po programu, ki je bil že opisan (Benčina in sod., 1994). Prenos proteinov na membrano je potekal identično kot pri točki 3.8.

3.8 PRENOS PROTEINOV IZ GELA NA MEMBRANO

Metodo prenosa proteinov iz gela na membrano smo izvedli na osnovi reference: Towbin in sod., 1979. Pri prenosu, ki poteka s pomočjo električnega toka, dobimo na membrani enak vzorec ločenih proteinov, kot smo ga imeli na gelu (Towbin in sod., 1979).

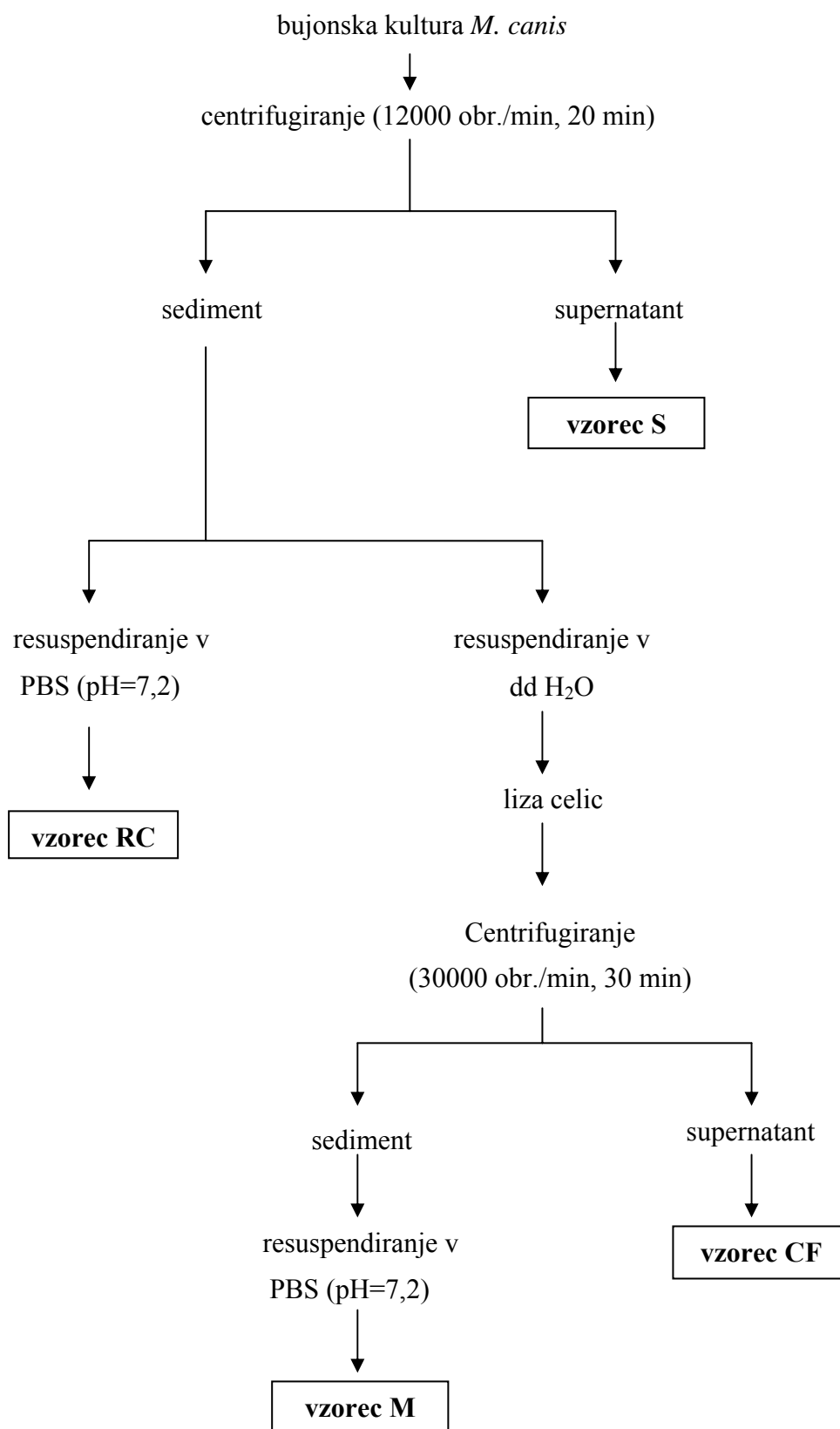
Proteine smo iz neobarvanega gela prenesli na Immobilone P PVDF (poliviniliden fluorid) membrano (Millipore, ZDA). Na katodni pokrov smo najprej položili dve blazinici ter 4 filter papirje, ki so imeli enake dimenzije kot gel. Tako blazinice kot filter papirje smo pred tem namočili v pufri za prenos proteinov (EBP = 10 mM CAPS [3 - cikloheksilamino 1 - propansulfonska kislina] v 10 % metanolu). Gel (brez nanašalnega gela), ki smo ga 5 minut pustili v EBP, smo položili na filter papirje, in sicer zrcalno obrnjena. Nato smo membrano aktivirali v 100 % metanolu, namočili v EBP ter jo z licem navzdol položili na gel. Tako gel kot membrano smo ustrezno označili, da smo tudi kasneje vedeli, kako sta pravilno orientirana. Na gel smo dodali še v EBP namočene 4 filter papirje in dve blazinici. Med nanašanjem smo med posameznimi plastmi odstranili mehurčke zraka, saj bi ti lahko motili prenos proteinov. Ko smo se prepričali, da se vse plasti dobro in tesno prilegajo, smo nanje namestili še anodno ploščo.

Prenos proteinov je potekal 2 do 2,5 ure pri 25 V in 190-175 mA. Tok pri katerem je potekal prenos proteinov, smo izračunali s pomočjo izračunane površine gela, ki smo jo pomnožili z 0,8 mA. Formula za izračun toka:

$$\text{površina gela} \times 0,8 \text{ mA}$$

Po končanem prenosu smo del membrane, na katerem je bila ena steza proteinov bakterije *M. canis* in referenčni markerji (z molekulskimi masami 170 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 56 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 26 kDa, 17 kDa in 11 kDa), odrezali ter jo sprali v destilirani vodi. Nato smo jo namočili za nekaj sekund v 100 % metanol ter jo prenesli v Coomassie brilliant blue R-250 (Pharmacia, ZDA). Membrano smo barvali toliko časa, da je postala intenzivno modra, nato pa smo jo razbarvali v 50 % metanolu. Po razbarvanju smo membrano sprali še z destilirano vodo.

Tako smo lahko določili položaj lis na membrani. Ostali del membrane smo prelili z BIN-om, da bi neposredno dokazali prisotnost in položaj encima. Pričakovali smo, da bo na membrano prenešana nevraminidaza s svojo aktivnostjo hidrolizirala substrat in se bo lisa obarvala modro.



Slika 3: Shematski prikaz postopkov pridobivanja vzorcev: celic, membran in citoplazme.

Preglednica 6: Vzorci in testi opravljeni s posameznimi vzorci.

Testirani vzorci Opravljeni testi	gojitveni medij- vzorec S	suspenzija celic- vzorec RC	membranska frakcija- vzorec M	citoplazemska frakcija-vzorec CF
dokazovanje nevraminidazne aktivnosti pri <i>M. canis</i>	ND	+	ND	ND
določanje tipa nevraminidaze	+	+	+	+
določanje nevraminidazne aktivnosti	ND	+	ND	ND
nevraminidazna aktivnost v odvisnosti od starosti kulture	ND	+	ND	ND
vpliv pH in Ca ²⁺ na nevraminidazno aktivnost	ND	+	ND	ND
vpliv T na nevraminidazno aktivnost	ND	+	ND	ND
ločitev celičnih proteinov s SDS-PAGE elektroforezo	ND	+	ND	ND
mini SDS elektroforeza	ND	+	ND	ND
sekvenciranje	ND	+	ND	ND

Opomba: V preglednici so z + označeni tisti poskusi, ki smo jih izvedli na posameznih vzorcih ter z ND poskusi, ki jih z vzorci nismo opravili.

4 REZULTATI

4.1 NEVRAMINIDAZNA AKTIVNOSTI *M. canis*

Pri našem delu se metoda s fluorogenim substratom ni izkazala za primerno. Reakcije so se sicer zelo hitro razvile vendar substrat na svetlobi zelo hitro razpade na produkte, tako da rezultatov ne moremo ustrezno dokumentirati, lahko pa dobimo tudi lažno pozitivne rezultate, če je nevraminidazna aktivnost šibka. Zaradi omenjenih slabosti te metode smo nevraminidazno aktivnost določali s pomočjo substrata BIN, ki je bolj stabilen.

4.2 DOKAZOVANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI PRI *M. canis*

Prisotnost nevraminidazne aktivnosti pri *M. canis* smo preverili z enostavnim testom. Suspenziji celic (vzorec RC) smo dodali za nevraminidazo specifičen substrat BIN. Rezultate smo odčitali eno uro po dodatku substrata. Suspenziji celic smo določili 5×10^7 CFU/ml.

Preglednica 7: Nevraminidazna aktivnost celične suspenzije *M. canis*.

	čas ocene (min)	redčitve vzorca RC					
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64
meritev 1	60	++	++	++	-	-	-
meritev 2	60	++	++	++	+	+	+

Opomba: ++ = intenzivno modra barva vzorca

+ = svetlo modra barva vzorca

- = brezbarven vzorec

Iz predhodnih testov smo predvidevali, da *Mycoplasma canis* ima nevraminidazo, kar smo posredno preko razgradnje substrata za nevraminidazo tudi potrdili. Nevraminidaza *Clostridium perfringens* je bila naša pozitivna kontrola in standard, ki v enakih testnih pogojih daje enako intenzivno pozitivno reakcijo.

4.3 PREVERJANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI CELIC *M. canis* VEZANIH NA MEMBRANO

Ker po SDS-PAGE na membrani s prenešenimi proteini nismo uspeli dokazati encimske aktivnosti, smo preverili ali vezava na membrano negativno vpliva na nevraminidazno aktivnost. To smo preverili z dodatkom substrata na blokirano in neblokirano membrano.

Na slikah 4 in 5 so predstavljeni rezultati nevraminidazne aktivnosti 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 in 1 : 32 redčenih suspenzij celic.



Slika 4: Nevraminidazna aktivnost celic *M. canis* vezanih na membrano, ki je bila nato blokirana v 0,5% Tween 20 PBS (30 min).



Slika 5: Nevraminidazna aktivnost celic *M. canis* vezanih na neblokirano membrano.

Preglednica 8: Nevraminidazna aktivnost celic *M. canis* vezanih na blokirano membrano.

čas ocene (min)	redčitve suspenzije celic <i>M. canis</i>				
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32
11	+	-	-	-	-
17	++	++	+	-	-
25	++	++	++	+	+

Opomba: ++ = intenzivno modra barva vzorca
 + = svetlo modra barva vzorca
 - = brezbarven vzorec

Preglednica 9: Nevraminidazna aktivnost celic *M. canis* vezanih na neblokirano membrano.

čas ocene (min)	redčitve suspenzije celic <i>M. canis</i>				
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32
11	++	+	-	-	-
17	++	++	++	-	-
25	++	++	++	++	++

Opomba: ++ = intenzivno modra barva vzorca

+ = svetlo modra barva vzorca

- = brezbarven vzorec

Iz slik 4 in 5 ter preglednic 8 in 9 lahko vidimo, da so reakcije na neblokirani membrani hitrejše in močnejše. Na podlagi dobljenih rezultatov sklepamo, da z vezavo celic na membrano ne preprečimo nevraminidazne aktivnosti. Razlog, da na membrani s prenešenim proteinskim profilom ni bilo moč dokazati reakcije je verjetno nekje v postopku elektroforeze ali prenosu na membrano.

4.4 TIP NEVRAMINIDAZE

Ko smo dokazali nevraminidazno aktivnost *M. canis*, smo želeli ugotoviti, ali je nevraminidazna aktivnost v citoplazmi, na (oz. v) membrani ali v gojišču. Zanimalo nas je torej, ali sintetizira citoplazemsko, membransko vezano ali ekstracelularno nevraminidazo.

Testirali smo gojitveni medij (vzorec S), membransko frakcijo (vzorec M) in citoplazemsko vsebino celic (vzorec CF). Ker smo vedeli, da nekatere vrste mikoplazem sintetizirajo ekstracelularne nevraminidaze, smo najprej preverili nevraminidazno aktivnost v gojitvenem mediju (supernatantu) v katerem je rasla kultura *M. canis*.

Preglednica 10: Nevraminidazna aktivnost v gojišču, v katerem je rasla *M. canis*.

čas ocene (min)	redčitve supernatanta gojišča					
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64
60	-	-	-	-	-	-

Opomba: - = brezbarven vzorec

V gojitvenem mediju brez celic nismo zaznali nevraminidazne aktivnosti, zato smo aktivnost preverili še v vzorcu z membranami (vzorec M) in citoplazemski frakciji (vzorec CF).

Preglednica 11: Nevraminidazna aktivnost vzorcev M in CF redčenih 1 : 20.

vzorec	čas merjenja (min)		
	10	20	30
vzorec M	-	+	++
vzorec CF	-	-	-

Opomba: ++ = intenzivno modra barva vzorca
 + = svetlo modra barva vzorca
 - = brezbarven vzorec

Nevraminidazno aktivnost smo zaznali le v vzorcu z membranami z redčitvijo 1 : 20. V citoplazemski frakciji z enako redčitvijo v časovnem intervalu 30 minut nevraminidazne aktivnosti ni bilo (preglednica 11). Rahlo modro obarvanost smo opazili po 24 urah.

Ko smo določili, da je aktivnost prisotna le v celičnem sedimentu (vzorcu RC) in membranski frakciji (vzorcu M) smo za nadaljne teste uporabljali kar suspenzijo celic (vzorec RC).

4.5 VREDNOTENJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI

Nevraminidazno aktivnost smo določali z vzorci resuspendiranih celic, ki so bile skoncentrirane za faktor 1000 glede na volumen kulture v bujonu.

Preglednica 12: Nevraminidazna aktivnost suspenzije celic *M. canis*.

vzorci	čas ocene (min)	redčitve suspenzije celic <i>M. canis</i>							
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1:128	1:256
kultura 1	10	+	-	-	-	-	-	-	-
	20	+	+	+	+	+	-	-	-
	40	+	+	+	+	+	+	-	-
	60	+	+	+	+	+	+	-	-
kultura 2	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	+	+	-	-	-	-	-	-
	40	+	+	+	+	-	-	-	-
	60	+	+	+	+	+	+	+	+
kultura 3	10	+	+	+	-	-	-	-	-
	20	+	+	+	+	+	-	-	-
	40	+	+	+	+	+	-	-	-
	60	+	+	+	+	+	-	-	-
kultura 4	10	+	+	-	-	-	-	-	-
	20	+	+	+	-	-	-	-	-
	40	+	+	+	+	-	-	-	-
	60	+	+	+	+	+	-	-	-

Opomba: Pri vseh meritvah je uporabljena 3 dni stara kultura.

+ = modra barva vzorca

- = brezbarven vzorec

Iz rezultatov vidimo, da je bila nevraminidazna aktivnost *M. canis* močna, saj smo pri vseh kulturah zaznali aktivnost znotraj ene ure pri redčitvah 1 : 32 ali celo višji (1 : 256). Pri skoraj vseh kulturah (razen kulturi 2), smo dobili pozitivne reakcije že v 10 minutah. Pri kulturi 3 smo po desetih minutah dobili pozitiven rezultat do redčitve 1 : 8.

Pri vseh kulturah smo dobili pozitivne reakcije do redčitve 1 : 32, pri kulturi 1 je bila reakcija pozitivna tudi pri redčitvi 1 : 64, pri kulturi 2 pa sta bili tudi redčitvi 1 : 128 in 1 : 256 rahlo pozitivni.

4.6 VPLIV pH IN KALCIJEVIH IONOV NA NEVRAMINIDAZNO AKTIVNOST

Vpliv pH in Ca^{2+} ionov na aktivnost nevraminidaze smo preverjali s celicami *M. canis*, resuspendiranimi v ustreznem pufri z oziroma brez kalcijevih ionov.

Kontrola je bila suspenzija celic *M. canis* v PBS s pH 7,2.

Preglednica 13: Merjenje nevraminidazne aktivnosti pri različnih pH vrednostih brez CaCl_2 .

čas (min)	pH=3	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8	pH=9	pH=10	kontrola
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	+	+	+	+	+	+	+	-
30	-	+	+	+	+	+	++	+	+

Opomba: ++ = intenzivno modra barva vzorca

+ = svetlo modra barva vzorca

- = brezbarven vzorec

Preglednica 14: Merjenje nevraminidazne aktivnosti pri različnih pH vrednostih z 10 mM CaCl_2 .

čas (min)	pH=3	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8	pH=9	pH=10	kontrola
5	-	+	+	+	+	+	+	+	-
10	-	+	+	+	+	+	+	+	-
30	-	+	+	+	+	+	++	+	+

Opomba: ++ = intenzivno modra barva vzorca

+ = svetlo modra barva vzorca

- = brezbarven vzorec

Iz naših meritev lahko vidimo, da je bil optimalni pH za delovanje nevraminidaze *M. canis* 9. Prisotnost kalcijevih ionov vpliva na hitrost delovanja encima. Pri merjenju aktivnosti v PBS z 10 mM CaCl_2 smo prve reakcije zaznali že po 5 minutah, medtem ko smo prve reakcije v PBS brez CaCl_2 zaznali šele po 10 minutah. V obeh primerih pa je bila reakcija kontrole (PBS, pH 7,2) po 10 min še negativna.

4.7 VPLIV TEMPERATURE NA NEVRAMINIDAZNO AKTIVNOST

Vpliv temperature na aktivnost nevraminidaze smo določili s preverjanjem encimske hidrolize substrata po enourni inkubaciji vzorca celic *M. canis* na 45 °C, 50 °C in 55 °C. Pozitivna kontrola je bil vzorec celic inkubiran na sobni temperaturi, za katerega smo že predhodno potrdili, da ima nevraminidazno aktivnost.

Inkubacija na 45 °C ni povzročila inaktivacije nevraminidaze. Reakcija je sicer potekala počasneje in smo dobili pozitiven rezultat šele po 45 minutah (sicer že po 10 min), vendar je bila reakcija močno pozitivna.

Inkubacija na 50 °C je povzročila delno inaktivacijo. Po eni uri, ki je bila izbrana kot čas, v katerem smo preverjali aktivnost encima, se pozitivna reakcija sicer ni razvila, vendar pa smo po 24 urah opazili rahlo modro obarvanost vzorca. Zato smo inaktivacijo ponovili, le da smo temperaturo povečali na 55 °C. Vzorec, inkubiran pri tej temperaturi, je ostal negativen. Ker se pozitivna reakcija ni razvila niti do naslednjega dne (kot je bilo to pri vzorcu inkubiranem na 50 °C), lahko trdimo, da temperatura 55 °C popolnoma prepreči nevraminidazno aktivnost, s čimer posredno sklepamo, da inaktivira encim.

Preglednica 15: Temperature enourne inkubacije in čas zaznave nevraminidazne aktivnosti.

temperatura inkubacije (°C)	čas zaznave aktivnosti
45	45 min
50	24 h
55	brez aktivnosti

4.8 AKTIVNOST NEVRAMINIDAZE V ODVISNOSTI OD STAROSTI KULTURE

Želeli smo ugotoviti kako se nevraminidazna aktivnost spreminja v odvisnosti od starosti kulture. Kulturo smo gojili do pozne logaritemske faze rasti, nato pa v treh zaporednih dneh vsak dan odvzeli vzorec. Odvzeti del kulture smo centrifugirali 20 minut pri 12000 obr./min ter usedlino celic resuspendirali v tolikšnem volumnu PBS (pH 7,2), da smo celice 100-krat skoncentrirali. Zadnji odvzeti vzorec smo pripravili v PBS s pH 7,2 in v PBS s CaCl₂ in pH 9. Tako pripravljenim vzorcem smo preverili nevraminidazno aktivnost.

Preglednica 16: Nevraminidazna aktivnost suspenzije celic 3 dni stare kulture *M. canis* (100-krat skoncentrirane celice v PBS s pH 7,2).

čas merjenja (min)	rečitve suspenzije celic <i>M. canis</i> (PBS s pH 7,2)							
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256
5	+	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	-	-	-	-	-	-
20	+	+	+	-	-	-	-	-
30	+	+	+	-	-	-	-	-
40	+	+	+	+	-	-	-	-
50	+	+	+	+	-	-	-	-
60	+	+	+	+	-	-	-	-

Opomba: + = modra barva vzorca
- = brezbarven vzorec

Preglednica 17: Nevraminidazna aktivnost suspenzije celic 4 dni stare kulture *M. canis* (100-krat skoncentrirane celice v PBS s pH 7,2).

čas merjenja (min)	rečitve suspenzije celic <i>M. canis</i> (PBS s pH 7,2)							
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256
5	+	+	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	-	-	-	-	-
20	+	+	+	+	+	-	-	-
30	+	+	+	+	+	+	-	-
40	+	+	+	+	+	+	-	-
50	+	+	+	+	+	+	-	-
60	+	+	+	+	+	+	-	-

Opomba: + = modra barva vzorca
- = brezbarven vzorec

Preglednica 18: Nevraminidazna aktivnost suspenzije celic 5 dni stare kulture *M. canis* (100-krat skoncentrirane celice v PBS s pH 7,2).

čas merjenja (min)	rečitve suspenzije celic <i>M. canis</i> (PBS s pH 7,2)							
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256
5	+	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	-	-	-	-	-
20	+	+	+	+	+	-	-	-
30	+	+	+	+	+	-	-	-
40	+	+	+	+	+	-	-	-
50	+	+	+	+	+	+	-	-
60	+	+	+	+	+	+	+	-

Opomba: + = modra barva vzorca
- = brezbarven vzorec

Preglednica 19: Nevraminidazna aktivnost suspenzije celic 5 dni stare kulture *M. canis* (100-krat skoncentrirane celice v PBS s CaCl₂ in pH 9).

čas merjenja (min)	rečitve suspenzije celic <i>M. canis</i> (PBS z 10 mM CaCl ₂ , pH 9)							
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256
5	+	+	+	+	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+	-	-	-
20	+	+	+	+	+	+	-	-
30	+	+	+	+	+	+	-	-
40	+	+	+	+	+	+	-	-
50	+	+	+	+	+	+	+	-
60	+	+	+	+	+	+	+	-

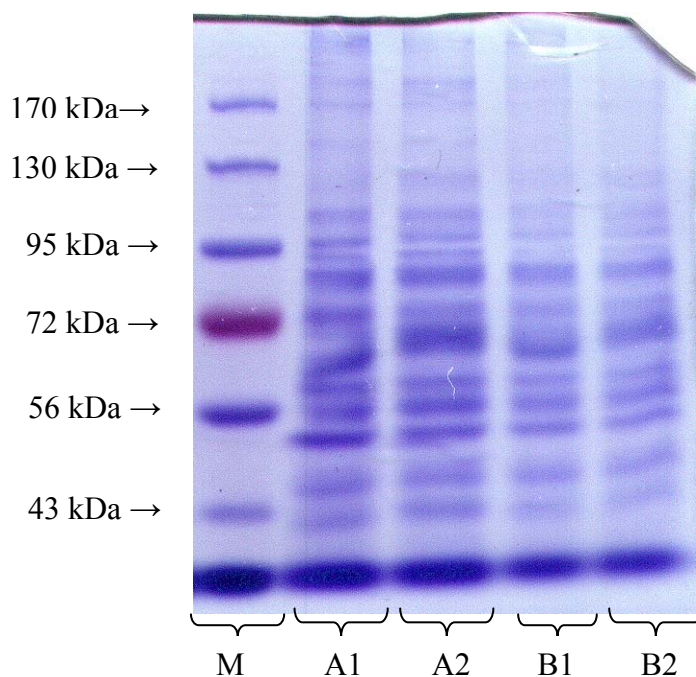
Opomba: + = modra barva vzorca
- = brezbarven vzorec

Iz rezultatov lahko vidimo, da s starostjo kulture nevraminidazna aktivnost narašča. Sklepamo, da večja kot je gostota celic, več je encima. Večje število molekul encima pa enako količino substrata hitreje hidrolizira.

Ponovno smo dokazali, da sta za hitrost encimske reakcije zelo pomembna pH ter prisotnost kofaktorjev. Encimske reakcije hitreje potečejo v pufru s pH 9 in Ca²⁺ kot v pufru s pH 7,2 in brez kalcijevih ionov.

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

Na sliki 1 lahko vidimo profil proteinov *M. canis*, ki smo ga dobili po ločitvi proteinov s SDS poliakrilamidno elektroforezo. Titer nevraminidazne aktivnosti analizirane kulture *M. canis* je bil 1 : 32.



Slika 6: Profil proteinov *M. canis* v gelu po SDS poliakrilamidni elektroforezi.

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

A1- suspenzija celic, liziranih s 5 % SDS. Vzorcju je namesto β -merkaptetanola dodan PBS pH 7,2 (nereducirajoči pogoji) Redčitev celic v nanašalnem vzorcju je 1 : 10.

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

B1- suspenzija celic, liziranih s 5 % SDS. Vzorcju je namesto β -merkaptetanola dodan PBS pH 7,2 (nereducirajoči pogoji) Redčitev celic v nanašalnem vzorcju je 1 : 20.

B2- suspenzija celic, liziranih s 5 % SDS. Vzorcju je dodan β -merkaptetanol (reducirajoči pogoji). Redčitev celic v nanašalnem vzorcju je 1 : 20.

Po elektroforezi smo proteine iz neobarvanega gela prenesli na membrano. En del membrane (eno stezo) smo pobarvali s Coomassie blue, drugo pa prelili s substratom.

Tako smo želeli identificirati nevraminidazo, kar pa nam žal ni uspelo, saj je bila po nanosu substrata reakcija nespecifična in nismo mogli določiti lise, v kateri smo pričakovali encim nevraminidazo.

Z mini SDS elektroforezo (PhastSystem, Pharmacia) smo uspeli dokazati nevraminidazno aktivnost na membrani po ločitvi proteinov *M. canis* ter po prenosu ločenih proteinov na membrano Immobilon P. Aktivnost smo zaznali v lisi, ki je vsebovala proteine velikosti 140 kDa. Zato smo lahko po prenosu proteinov iz velikega gela na membrano Immobilon P izrezali liso v kateri so bili proteini velikosti 140 kDa. Ta vzorec smo poslali na Inštitut Jožeta Štefana, kjer so določili N-terminalno aminokislinsko zaporedje proteinov. Določili so dve zaporedji: MNPLVEPAKN in EKAQFSIV(L)P, za kateri pa ne moremo trditi, da pripadata proteinu z nevraminidazno aktivnostjo.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Mikoplazme se filogenetsko od drugih bakterij ločijo po majhnem genomu in velikosti ter odsotnosti celične stene (Razin in sod., 1998; Bove, 1993). Patogenost nekaterih vrst mikoplazem je že dokazana, drugih še ne. Znano je, da nekatere vrste mikoplazem povzročajo ekonomsko pomembne bolezni prežvekovalcev, prašičev in perutnine. Ptičje mikoplazme (*M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis* in *M. iowae*) povzročajo izgube na farmah piščancev in puranov (Bradbury, 1998, cit. po Berčič in sod., 2008; Kleven, 2003a, cit. po Berčič). Patogenost *M. canis* še ni v celoti dokazana, zato so potrebne še dodatne raziskave na tem področju (L'Abée-Lund in sod., 2003).

Mikoplazme so izjemno prilagojene na gostitelja in običajno povzročajo blage in kronične okužbe. Poškodbe, ki nastanejo, so lahko tudi posledica delovanja imunskega sistema gostitelja (Razin 1998). Preživetje znotraj gostitelja jim omogočajo izmikanje imunskemu sistemu z mimikrijo gostiteljskih antigenov, fenotipska variabilnost in preživetje znotraj fagocitirajočih in nefagocitirajočih celic (Rottem, 2003).

Vrste mikoplazem, ki so patogene za človeka ali domače živali nimajo endotoksinov ali klasičnih eksotoksinov. Ker je v patogenezi mikoplazem pritrjanje na celice pomembno, so bile študije patogeneze usmerjene v raziskovanje adhezinov in sprememb gostiteljskih celic, ki nastanejo ob vezavi mikoplazem. Raziskav o faktorjih, ki mikoplazmam omogočajo lažje širjenje v gostitelju (kot na primer sialidaze, hialuronidaze in mucinaze), so nekoliko na stranskem tiru in je o tem le malo napisanega tudi v izčrpnih preglednih člankih o patogenezi mikoplazem (Razin in sod., 1998; Rottem, 2003; Brown in sod., 2004).

Nevraminidaza in sialična kislina, ki je substrat tega encima sta v patogenezi bakterij pomembna dejavnika. Sialično kislino bakterije pridobivajo iz gostitelja (bodisi v obliki proste sialične kisline ali s cepitvijo sialokonjugatov) ali pa jo sintetizirajo same. Vgraditev sialične kisline v lipopolisaharide membran ali kapsule bakterijam omogoči izmikanje

imunskemu sistemu (Harvey in sod., 2001). To kislino lahko bakterije uporabijo tudi kot vir dušika in ogljika ali kot receptor za vezavo na gostiteljske celice (Vimr in sod., 2004; Severi in sod., 2005; Roberts in sod., 1989). Zmožnost sinteze nevraminidaze bakterijam predstavlja veliko prednost v pridobivanju sialične kisline, saj so v nasprotnem primeru odvisne od nevraminidaz drugih bakterij oziroma gostiteljskih nevraminidaz, ki se sproščajo med vnetjem (Shakhnovich in sod., 2002; Sohanpal in sod., 2004). Prednost jim predstavlja tudi pri širjenju, saj desializacija sproži depolimerizacijo zunajceličnega matriksa z drugimi encimi, zaradi česar se zmanjša viskoznost veziva in širjenje bakterije je olajšano (Ponnuraj in Jedrzejcas, 2000).

Za preverjanje nevraminidazne aktivnosti pri *M. canis* smo se odločili za enega od dveh preprostih testov in izbrali test s kromogenim substratom BIN namesto testa s fluorogenim substratom. Za test s kromogenim substratom smo se odločili predvsem zaradi enostavne ocene in manjše možnosti nastanka lažno pozitivnih rezultatov. Reakcije z fluorogenim substratom so namreč zelo hitre in lahko že po desetih minutah zaznamo pozitivno reakcijo. Substrat je nestabilen na svetlobi in hitro razpade na produkte in je zato negativna kontrola fluorescirala v zelo kratkem času po dodatku substrata. V zadnjem času se za merjenje nevraminidazne aktivnosti uporabljajo predvsem sintetični substrati z znano kemijsko strukturo, s pomočjo katerih lahko merimo intenziteto barve ali fluorescence. V preteklosti so uporabljali veliko število naravnih substratov kot so npr. ovomucin, fetuin, transferin, gangliozidi možganov ter sluz različnih vretenčarjev, vendar so bili testi bolj zapleteni in dolgotrajnejši (Abrashev in Dulgueraova, 2000).

Prisotnost nevraminidaze pri *M. canis* smo dokazali posredno preko razgradnje substrata, ki je specifičen za nevraminidazo. Nevraminidazo so večinoma dokazali pri patogenih bakterijah izoliranih iz gostiteljev z različnimi okužbami. Pri teh patogenih bakterijah je navadno nevraminidazna aktivnost relativno velika. Manjšo nevraminidazno aktivnost so odkrili tudi pri bakterijah, ki niso patogene. Mnoge take nepatogene bakterije živijo v simbiotskem odnosu s svojim gostiteljem, bodisi v intestinalnem traktu ali ustni votlini. Vendar pa povezanost z gostiteljem ni pogoj za sintezo nevraminidaze. Encim so našli tudi pri mikroorganizmih, ki živijo v prsti (npr. pri bakteriji *Arthrobacter* sp.) (Corfield, 1992).

Nevraminidazo nekateri mikroorganizmi izločajo v okolje ali pa je vezana na membrano. Nekateri imajo več vrst nevraminidaz (vezane in take, ki se izločijo) (Corfield, 1992). Da bi ugotovili kakšen tip nevraminidaze sintetizira *M. canis* smo preverili aktivnost supernatanta gojitvenega medija v katerem je rastla *M. canis*, suspenzije celih celic *M. canis*, membranske frakcije in citoplazemske frakcije. Pri vzorcih celih celic in membran smo opazili pozitivne reakcije že po 30 min. Vzorec gojišča je bil negativen tudi po prekonočni inkubaciji, vzorec citoplazemske frakcije pa se je po 24 urah rahlo obarval modro. Na podlagi teh rezultatov lahko posredno preko nevraminidazne aktivnosti sklepamo, da *M. canis* sintetizira na membrano vezano nevraminidazo, ne pa tudi izvencelične nevraminidaze. Po 24 urah je bil tudi vzorec z citoplazemskimi proteini rahlo pozitiven, kar je najverjetneje posledica dela sintetizirane nevraminidaze, ki se še ni prenesla in vezala na membrane.

Aktivnost nevraminidaze *M. canis* smo vrednotili s spremljanjem nevraminidazne aktivnosti suspenzije celic. Za časovni okvir znotraj katerega smo spremljali aktivnost smo določili čas ene ure. Glede na bujonsko kulturo je bila suspenzija celic vedno 1000-krat skoncentrirana. Iz preglednice 12 lahko vidimo, da smo pri vseh meritvah dobili pozitivne reakcije znotraj ene ure. Pri vseh kulturah (razen pri kulturi 2) so se prve pozitivne reakcije pojavile že po desetih minutah inkubacije. Pri dveh kulturah smo dobili reakcije pozitivne do redčitve 1 : 64, pri eni kulturi (kultura 2) pa sta bili v času ene ure pozitivni reakciji tudi pri celični suspenziji redčeni 1 : 128 in 1 : 256. Glede na to, da so pri kulturah znotraj ene ure reakcije pozitivne vsaj do redčitve 1 : 32 lahko trdimo, da ima *M. canis* močno nevraminidazno aktivnost. *M. canis* je uvrščena v *M. synoviae* filogenetsko gručo. Močno nevraminidazno aktivnost so odkrili tudi pri nekaterih ostalih vrstah te gruče, med katerimi sta tudi nevraminidazni aktivnosti *M. alligatoris* in *M. corogypsi* (Brown in sod., 2004; Berčič in sod., 2008).

Iz preglednic 16-19 je razvidno, da nevraminidazna aktivnost s starostjo kulture *M. canis* narašča. S starostjo kulture namreč število celic v gojišču narašča, posledično pa je tudi encima več. Ob enaki dodani količini substrata pa večje število enot encima hitreje razgradi substrat, zaradi česar dobimo v intervalu ene ure pozitivne rezultate pri vedno večjih redčitvah vzorca.

Da bi čim boljše določili lastnosti nevraminidaze, smo želeli ugotoviti, kakšen je vpliv temperature na aktivnost encima, določiti pH optimum in vpliv kalcijevih ionov na aktivnost ter določiti vsaj približno molekulsko maso.

Zanimalo nas je predvsem na kolikšni temperaturi nevraminidaza izgubi svojo aktivnost po enourni inkubaciji. Glede na to, da je temperaturni optimum večine bakterijskih nevraminidaz med 35 °C in 40 °C (Abrashv in Dulguerova, 2000), smo poskus opravili pri temperaturah višjih od 45 °C. Temperatura 45 °C ni inaktivirala encima. Vpliv povišane temperature se je sicer že izrazil, saj smo dobili reakcijo pozitivno šele po 45 minutah, vendar pa za popolno inaktivacijo encima temperatura ni bila dovolj visoka. Še večji vpliv temperature smo opazili na 50 °C, ko je bila reakcija pozitivna šele po 24 urah. Šele enourna inkubacija na 55 °C je popolnoma inaktivirala nevraminidazo. Nevraminidaza *M. gallisepticum* izgubi aktivnost po 50 minutnem segrevanju na 70 °C (Sethi in Müller, 1972).

Optimalni pH za delovanje večine bakterijskih nevraminidaz je v območju kislega in nevtralnega pH in sicer med 5 in 7. Zato smo pričakovali, da bo tudi pH optimum nevraminidaze *M. canis* znotraj tega območja. Vendar pa dobljeni rezultat ne potrjujejo naših pričakovanj. Glede na dobljene rezultate je namreč optimalni pH delovanja nevraminidaze *M. canis* 9, torej v bazičnem pH. Optimalni pH delovanja encima je lahko odvisen tudi od vrste substrata. Nevraminidaza *M. gallisepticum* ima optimalni pH za hidrolizo humanega transferina in α_1 -glikoproteina ter zajčjega seruma pri 5,8, medtem, ko je optimalni pH za hidrolizo N – acetilnevraminil - laktoze pri 4,5 (Sethi in Müller, 1972).

S preverjanjem aktivnosti v prisotnosti oziroma odsotnosti kalcijevih ionov, smo ugotovili, da nevraminidaza *M. canis* sodi v tisto skupino bakterijskih nevraminidaz, ki za svojo aktivnost ne potrebujejo Ca^{2+} . Reakcije potekajo tudi v odsotnosti Ca^{2+} , vendar pa ob dodatku ionov potekajo hitreje. Za optimalno aktivnost potrebujejo Ca^{2+} nevraminidaze *Corynebacterium ulcerans* (Vertiev in Ezepechuk, 1981), *Clostridium chauvoei* (Heuermann in sod., 1991), streptokoki skupine A in B (Davis in sod., 1979; Brown in Straus, 1987), *Vibrio cholerae* (Vimr in sod., 1988) ter *M. gallisepticum* (Sethi in Müller, 1972).

Molekulska masa nevraminidaze *M. canis* smo želeli določiti po ločitvi proteinov celic *M. canis* s klasično SDS poliakrilamidno elektroforezo ter prenosu proteinov na membrano. Na membrano prenešen encim smo želeli določiti s pomočjo njegove nevraminidazne aktivnosti, vendar nam ni uspelo. Na membrano vezan encim ni bil aktiven, zato smo preverili, kako vezava celic *M. canis* na membrano vpliva na nevraminidazno aktivnost. Naši rezultati kažejo na to, da vezava ne prepreči njegove aktivnosti, le reakcije na z Tween 20 PBS blokirani membrani so bile nekoliko počasnejše. To bi lahko bila posledica delovanja neionskega detergenta Tween 20 na encim. Ker pa smo po prenosu proteinov na membrano aktivnost preverjali na neblokirani membrani je izguba aktivnosti nevraminidaze najverjetneje posledica delovanja SDS med potekom elektroforeze in/ali visoke temperature med elektroforezom in procesom prenosa proteinov iz gela na membrano.

Nevraminidazno aktivnost na membrani smo dokazali po ločitvi proteinov *M. canis* z mini SDS elektroforezo ter prenosu na membrano. Tako smo lahko določili molekulska masa encima z nevraminidazno aktivnostjo.

Za dobljeno N-terminalno aminokislinsko zaporedje ne moremo trditi da pripada encimu z nevraminidazno aktivnostjo (ker po ločitvi proteinov *M. canis* s klasično elektroforezo in prenosu na membrano nismo uspeli dokazati nevraminidazne aktivnosti). Trdimo lahko le, da zaporedje pripada proteinu, ki ima molekulska masa podobno tisti, ki jo ima protein, ki deluje kot nevraminidaza.

5.2 SKLEPI

- *Mycoplasma canis* ima nevraminidazno aktivnost, na podlagi katere lahko sklepamo, da sintetizira encim nevraminidazo.
- *M. canis* sintetizira na membrano vezano nevraminidazo, ki se verjetno ne izloča.
- Nevraminidaza *M. canis* ima optimalni pH delovanja v bazičnem območju pH in sicer pri pH 9.
- Nevraminidazo inaktivira enourna inkubacija na 55°C.
- Nevraminidaza za svoje delovanje ne potrebuje kalcijevih ionov, če pa so prisotni, so reakcije hitrejše.
- Nevraminidazna aktivnost *M. canis* je visoka in se s starostjo kulture povečuje.
- N-terminalno aminokislinsko zaporedje pripada proteinu, ki ima enako molekulsko maso kot protein z nevraminidazno aktivnostjo.

6 POVZETEK

Mikoplazme so skupina mikroorganizmov z edinstvenimi lastnostmi. So mikroorganizmi z najmanjšim znanim genomom, ki pa so kljub temu zmožne samostojnega podvojevanja. Nimajo celične stene in za rast potrebujejo zelo kompleksna gojišča. Ravno zaradi kompleksnih rastnih zahtev jih dolgo niso znali gojiti. Naravni habitati mikoplazem patogenih za ljudi in živali so sluznice dihalnega in urogenitalnega trakta, sklepi, oči in mlečne žleze. Izven gostiteljev ne preživijo dolgo. Nimajo endotoksinov in klasičnih eksotoksinov. V patogenezi mikoplazem je pomembno pritrjanje na gostiteljske celice. Večina mikroorganizmov, ki večji del svojega življenja preživijo kot komenzali ali fakultativni patogeni pogosto sintetizirajo nevraminidazo, ki je pomemben virulenčni dejavnik. Geni z zapisom za nevraminidazo so med mikroorganizmi zelo neenakomerno porazdeljeni, zato najverjetneje niso esencialni za preživetje.

Bakterijo *Mycoplasma canis* so našli pri psih z urogenitalnimi okužbami in neplodnostjo, vendar še ni znano ali je povzročitelj bolezni ali le del mikroflore, ki je prisotna med okužbo. Čeprav je uvrščena med pasje mikoplazme, psi niso edini gostitelj. Našli so jo tudi pri zdravem in bolnem govedu ter človeku z obolelimi dihali.

Namen dela je bil ugotoviti, ali ima *Mycoplasma canis* nevraminidazno aktivnost. Posredno preko nevraminidazne aktivnosti smo sklepali na prisotnost encima nevraminidaze. Encimu smo določili pH optimum, vpliv kalcijevih ionov na njegovo aktivnost ter temperaturno območje delovanja. Za določanje nevraminidazne aktivnosti suspenzije celic *M. canis* ter tipa nevraminidaze smo uporabili enostaven test s kromogenim substratom. Za identifikacijo nevraminidaze smo uporabili SDS poliakrilamidno elektroforezo s katero smo ločili proteine celic *M. canis*, nato pa iz neobarvanega gela proteinski profil prenesli na PVDF membrano. Po prenosu proteinov smo membrano prelili s substratom, ki ga encim razgradi do modro obarvanega netopnega produkta. Pričakovali smo, da se bo lisa, v kateri je encim z nevraminidazno aktivnostjo obarvala modro. Zato smo preverili, če vezava celic na membrano in blokiranje membrane vpliva na nevraminidazno aktivnost. Nevraminidazno aktivnost smo dokazali na membrani, na katero smo prenesli proteine ločene z mini SDS elektroforezo.

7 VIRI

- Abrashev I., Dulguerova G. 2000. Neuraminidase (sialidases) from bacterial origin. *Experimental Pathology and Parasitology*, 4: 35-40
- Aisaka K., Igarashi A., Uwajima T. 1991. Purification, crystallization, and characterization of neuraminidase from *Micromonospora viridifaciens*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 4: 997-1004
- Almagor M., Kahane I., Gilon C., Yatziv S. 1986. Protective effects of the glutathione redox cycle and vitamin E on cultured fibroblasts infected by *Mycoplasma pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 52, 1: 240-244
- Angata T., Varki A. 2002. Chemical diversity in the sialic acids and related α -keto acids: an evolutionary perspective. *Chemical Reviews*, 102, 2: 439-469
- Appendix 2. Taxonomic outline of the *Archaea* and *Bacteria*. 2005. V: *Bergey's manual of systematic bacteriology: Vol. 2: The proteobacteria: Part A: Introductory essays*. 2nd ed. Garrity G. M. (ed. in chief); Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T. (eds). New York, Springer: 207-220
- Armstrong D., Yu B. H., Yagoda A., Kagnoff M. F. 1971. Colonization of humans by *Mycoplasma canis*. *Journal of Infectious Diseases*, 124: 607-609
- Benčina D., Kleven S. H., Elfaki M. G., Snoj A., Dovč P., Dorrer D., Russ I. 1994 Variable expression of epitopes on the surface of *Mycoplasma gallisepticum* demonstrated with monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 23: 19-36
- Berčič R. L., Slavec B., Lavrič M., Narat M., Zorman-Rojs O., Dovč P., Benčina D. 2008. A survey of avian *Mycoplasma* species for neuraminidase enzymatic activity. *Veterinary Microbiology*, 130: 391-397

Bergey's manual of determinative bacteriology. 1994. 9th ed. Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. Y. (eds). Baltimore, Williams and Wilkins: 787 str.

Biberfeld G. 1979. Autoimmune reactions associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie, 245, 1-2: 144-149

Bouchet V., Hood D. W., Li J., Brisson J. R., Randle G. A., Martin A., Li Z., Goldstein R., Schweda E. K. H., Pelton S. I., Richards J. C., Moxon E. R. 2003. Host derived sialic acid is incorporated into *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100: 8898–8903

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

Bowe P. S., Kruiningen H. J., Rosendal S. 1982. Attempts to produce granulomatous colitis in Boxer dogs with a mycoplasma. Canadian Journal of Comperative Medicine, 46: 430-433

Brown J. G., Straus D. C. 1987. Characterization of neuraminidases produced by various serotypes of group B streptococci. Infection and Immunity, 55: 1-6

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

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

- Chalker V. J. 2005. Canine mycoplasmas. *Research in Veterinary Science*, 79: 1-8
- Chalker V. J., Brownlie J. 2004. Taxonomy of canine Mollicutes by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 537-542
- Colman P. M. 1994. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, 3: 1687-1696
- Corfield T. 1992. Bacterial sialidases – roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiology*, 2: 509–521
- Dallo S. F., Chavoya A., Baseman J. B. 1990. Characterization of the gene for a 30-kDa adhesin-related protein of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 58: 4163–4165
- Davis L., Baig M. M., Ayoub E. M. 1979. Properties of extracellular neuraminidase produced by group A *Streptococcus*. *Infection and Immunity*, 34: 780-786
- Dirksen L. B., Proft T., Hilbert H., Plagens H., Herrmann R., Krause D. C. 1996. Nucleotide sequence analysis and characterization of the *hmw* gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae*. *Gene*, 171, 1: 19-25
- Edwards D. G., Fitzgerald W. A. 1951. The isolation of organisms of the pleuropneumonia group from dogs. *Journal of General Microbiology*, 5: 566-575
- Ernst S., Langer R., Cooney C. L., Sasisekharan R. 1995. Enzymatic degradation of glycosaminoglycans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 5: 387-444

Feizi T., Childs R. A. 1985. Carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids as differentiation antigens, tumour-associated antigens and components of receptor systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 10, 1: 24-29

Fraser C. M., Gocayne J. D., White O., Adams M. D., Clayton R. A., Fleischmann R. D., Bult C. J., Kerlavage A. R., Sutton G., Kelley J. M., Fritchman J. L., Weidman J. F., Small K. V., Sandusky M., Fuhrmann J., Nguyen D., Utterback T. R., Saudek D. M., Phillips C. A., Merrick J. M., Tomb J.-F., Dougherty B. A., Bott K. F., Hu P.-C., Lucier T. S., Petterson S. N., Smith H. O., Hutchison C. A., Venter J. C. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270: 397-403

Gardella R. S., DelGuidice R. A. 1983. Hemagglutination, hemadsorption and hemolysis. V: *Methods in mycoplasmaology*. 1st ed. Razin S., Tully J. G. (eds). New York, Academic Press: 225-233

Geary S. J., Gabridge M. G., Intres R., Draper D. L., Gladd M. F. 1990. Identification of mycoplasma binding proteins utilizing a 100 kilodalton lung fibroblast receptor. *Journal of Receptor Research*, 9: 465-478

Grobe K., Sartori B., Traving C., Schauer R., Roggentin P. 1998. Enzymatic and molecular properties of the *Clostridium tertium* sialidase. *Journal of Biochemistry*, 124, 6: 1101-1110

Harvey H. A., Swords W. E., Apicella, M. A. 2001. The mimicry of human glycolipids and glycosphingolipids by the lipooligosaccharides of pathogenic *Neisseria* and *Haemophilus*. *Journal of Autoimmunity*, 16, 3: 257-262

Heuermann D., Roggentin P., Kleineidam R. G., Schauer R. 1991. Purification and characterization of a sialidase from *Clostridium chauvoei* NC08596. *Glycoconjugate Journal*, 8, 2: 95-101

- Himmelreich R., Hilbert H., Plagens H., Pirkl E., Li B. C., Herrmann R. 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, 24: 4420–4449
- Inamine J. M., Denny T. P., Loechel S., Schaper U., Huang C. H., Bott K. F., Hu P. C. 1988. Nucleotide sequence of the P1 attachment-protein gene of *Mycoplasma pneumoniae*. *Gene* 64, 2: 217–229
- Johansson K. E., Pettersson B. 2002. Taxonomy of Mollicutes. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Rasin S., Hermann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 31-44
- Kahane I., Reisch-Saada A., Almagor M., Abeliuck P., Yatziv S. 1990. Glycosidase activities of mycoplasmas. *Zentralblatt für Bakteriologie = International Journal of Medical Microbiology*, 273, 3: 300-305
- Krause D. C. 1996. *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: unravelling the tie that binds. *Molecular Microbiology*, 20, 2: 247–253
- Krause D. C., Leith D. K., Wilson R. M., Baseman J. B. 1982. Identification of *Mycoplasma pneumoniae* protein associated with hemadsorption and virulence. *Infection and Immunity*, 35: 809-817
- Krivan H. C., Olson L. D., Barile M. F., Ginsburg V., Roberts D. D. 1989. Adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to sulfated glycolipids and inhibition by dextran sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 9283–9288
- L'Abée-Lund T. M., Heiene R., Friis N. F., Ahrens P., Sorum H. 2003. *Mycoplasma canis* and urogenital disease in dogs in Norway. *Veterinary Record*, 153, 8: 231-235

Lo S. C. 1992. Mycoplasmas in AIDS. V: Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis. Maniloff J., McElhaney R. N., Finch L. R., Baseman J. B. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology: 525-548

Lo S. C., Hayes M. M., Kotani H., Pierce P. F., Wear D. J., Newton P. B., Tully J. G., Shih J. W. 1993. Adhesion onto and invasion into mammalian cells by *Mycoplasma penetrans*: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. *Modern Pathology*, 6, 3: 276–280

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

Matsushita O., Okabe A. 2001. Clostridial hydrolytic enzymes degrading extracellular components. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 39, 11: 1769-1780

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

May M., Kleven S. H., Brown D. R. 2007. Sialidase activity in *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 51, 4: 829-833

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

Megid R., Nicholas R. A. J., Miles R. J. 2001. Biochemical characterization of *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar* and recent bovine isolates of *Mycoplasma canis*. *Veterinary Research Communications*, 25: 1-12

Messick J. B., Walker P. G., Raphael W., Berent L., Shi X. 2002. '*Candidatus mycoplasma haemodidelphidis*' sp. nov., '*Candidatus mycoplasma haemolamae*' sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 693-698

Miles R. J., Taylor R. R., Varsani H. 1991. Oxygen uptake and H₂O₂ production by fermentative *Mycoplasma* spp. *Journal of Medical Microbiology*, 34, 4: 219-223

Miyata M., Seto S. 1999. Cell reproduction cycle in mycoplasma. *Biochimie*, 81, 8-9: 873-878

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

Nicholas R. A., Hannam D. A., Baker S. E., Weaver C. R., Laak E. A. 1995. *Mycoplasma canis* in British calf. *Veterinary Record*, 137: 443-444

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

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

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

- Pollack J. D., Williams M. V., Mcelhaney R. N. 1997. The comparative metabolism of the Mollicutes (mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function. *Critical Reviews in Microbiology*, 23, 4: 269–354
- Ponnuraj K., Jedrzejewski M. J. 2000. Mechanism of hyaluronan binding and degradation: structure of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase in complex with hyaluronic acid disaccharide at 1.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 299, 4: 885-895
- Potier M., Mameli L., Belisle M., Dallaire L., Melancon S. B. 1979. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminate) substrate. *Analytical Biochemistry*, 94, 2: 287-296
- Previato J. O., Andrade A. F., Pessolani M. C., Mendonça Previato L. 1985. Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16, 1: 85-96
- Randolph J. F., Moise N. S., Scarlett J. M., Shin S. J., Blue J. T., Bookbinder P. R. 1993. Prevalence of mycoplasmal and ureaplasma recovery from tracheobronchial lavages and prevalence of mycoplasmal recovery from pharyngeal swab specimens in dogs with or without pulmonary disease. *American Journal of Veterinary Research*, 54: 387-391
- Razin S. 1978. The mycoplasmas. *Microbiological Reviews*, 42, 2: 414-470
- Razin S. 1999. Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. *Bioscience Reports*, 19, 5: 367-372
- Razin, S., Oliver O. 1961. Morphogenesis of mycoplasma and bacterial L-form colonies. *Journal of General Microbiology*, 24: 225–237
- Razin S, Yogev D., Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 4: 1094-1156

- Roberts D. D., Olson L. D., Barile M. F., Ginsburg V., Krivan H. C. 1989. Sialic acid-dependent adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to purified glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 264: 9289–9293
- Rodwell A. W., Whitcomb R. F. 1983. Cell lysis and isolation of membranes. V: *Methods in mycoplasmology*. 1st ed. Razin S., Tully J. G. (eds). New York, Academic Press: 225-233
- Rodwell A. W., Whitcomb R. F. 1983. Method for direct and indirect measurement of mycoplasma growth. V: *Methods in mycoplasmology*. 1st ed. Razin S., Tully J. G. (eds). New York, Academic Press: 185-196
- Roggentin P., Rothe B., Kaper J. B., Galen J., Lawrisuk L., Vimr E. R., Schauer R. 1989. Conserved sequences in bacterial and viral sialidases. *Glycoconjugate Journal*, 6, 3: 349-353
- Roggentin P., Rothe B., Lottspeich F., Schauer R. 1988. Cloning and sequencing of a *Clostridium perfringens* sialidase gene. *FEBS Letters*, 238, 1: 31-34
- Roggentin P., Schauer R., Hoyer L. L., Vimr E. R. 1993. The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer. *Molecular Microbiology*, 9, 5: 915-921
- Rosendal S. 1975. Canine mycoplasmas: cultural and biochemical studies of type and reference strains. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology*, 83: 457-462
- Rosendal S. 1982. Canine mycoplasma: their ecologic niche and role in disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 180: 1212-1214
- Rottem S. 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiological Reviews*, 83: 417-432

- Rottem S., Barile M. F. 1993. Beware of mycoplasmas. *Trends in Biotechnology*, 11, 4: 143-151
- Sasaki Y. 2006. Mycoplasma. V: *Bacterial genomes and infectious diseases*. Chan V. L., Sherman P. M., Bourke B. (eds.). New Jersey, Humana Press: 175-190
- Scharmann W., Drzeniek R., Blobel H. 1970. Neuraminidase of *Pasteurella multocida*. *Infection and Immunity*, 3, 1: 319-320
- Schauer R. 2000. Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconjugate Journal*, 17: 485-499
- Sethi K. K., Müller H. E. 1972. Neuraminidase activity in *Mycoplasma gallisepticum*. *Infection and Immunity*, 5, 2: 260-262
- Severi E., Hood D. W., Thomas G. H. 2007. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology*, 153: 2817-2822
- Severi E., Randle G., Kivlin P., Whitfield K., Young R., Moxon R., Kelly D., Hood D., Thomas G. H. 2005. Sialic acid transport in *Haemophilus influenzae* is essential for lipopolysaccharide sialylation and serum resistance and is dependent on a novel tripartite ATP-independent periplasmic transporter. *Molecular Microbiology*, 58, 4: 1173–1185
- Shakhnovich E. A., King S. J., Weiser J. N. 2002. Neuraminidase expressed by *Streptococcus pneumoniae* desialylates the lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*: a paradigm for interbacterial competition among pathogens of the human respiratory tract. *Infection and Immunity*, 70: 7161-7164
- Shell D. M., Chiles L., Judd R. C., Seal S., Rest R. F. 2002. The *Neisseria* lipooligosaccharide-specific alpha-2,3-sialyltransferase is a surface-exposed outer membrane protein. *Infection and Immunity*, 70, 7: 3744-3751

- Shibata K. I., Sasaki T., Watanabe T. 1995. AIDS-associated mycoplasmas possess phospholipases C in the membrane. *Infection and Immunity*, 63, 10: 4174-4177
- Sohanpal B. K., El Labany S., Lahooti M., Plumbridge J. A., Blomfield I. C. 2004. Integrated regulatory responses of fimB to N-acetylneuraminic (sialic) acid and GlcNAc in *Escherichia coli* K-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 46: 16322–16327
- Soong G., Muir A., Gomez M. I., Waks J., Reddy B., Planet P., Singh P. K., Kanetko Y., Wolfgang M. C., Hsiao Y. S., Tong L., Prince A. 2006. Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production. *Journal of Clinical Investigation*, 116, 8: 2297-2305
- Taylor R. R., Mohan K., Miles R. J. 1996. Diversity of energy-yielding substrates and metabolism in avian mycoplasmas. *Veterinary Microbiology*, 51, 3-4: 291-304
- Thomas A., Ball H., Dizier I., Trolin A., Bell C., Mainil J., Linden A. 2002. Isolation of mycoplasma species from the lowerrespiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. *The Veterinary Record*, 151, 16: 472-476
- ter Laak E. A., Tully J. G., Noordergraaf H. H., Rose D. L., Carle P., Bove J. M., Smits M. A. 1993. Recognition of *Mycoplasma canis* as part of the mycoplasmal flora of the bovine respiratory tract. *Veterinary Microbiology*, 34: 175-189
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 9: 4350-4354
- Trachtenberg S. 2005. Mollicutes. *Current Biology*, 15, 13: R483-R484

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

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

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

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

Vertiev Y. V., Ezepechuk Y. V. 1981. Purification and characterization of some enzymatic properties of neuraminidase from *Corynebacterium ulcerans*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 362: 1339-1344

Vimr E. R. 1994. Microbial sialidases: does bigger always mean better? *Trends in Microbiology*, 2: 271-277

Vimr E. R., Kalivoda K. A., Deszo E. L., Steenbergen S. M. 2004. Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 1: 132-153

Vimr E. R., Lawrisuk L., Galen J., Kaper J. B. 1988. Cloning and expression of the *Vibrio cholerae* neuraminidase gene *nanH* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 170: 1495-1504

Vimr E., Lichtensteiger C. 2002. To sialylate, or not to sialylate: that is the question. *Trends in Microbiology*, 10, 6: 254–257

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

8 ZAHVALA

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

Zahvaljujem se tudi znanstvenemu svetniku dr. Dušanu Benčini za hiter in temeljit pregled diplomske naloge, vodenje pri laboratorijskem delu in koristne pripombe.

Zahvaljujem se tudi vsem tistim na Oddelku za zootehniko, ki so mi v času laboratorijskega dela kakorkoli priskočili na pomoč. Hvala tudi za vaše nasvete.

Posebna zahvala je namenjena mojim staršem, ki so mi omogočili študij, me podpirali, bodrili in verjeli vame vsa ta leta. Brez vas mi zagotovo ne bi uspelo!