

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jernej OBREZA

**LASTNOSTI MEMBRANSKIH PROTEINOV
BAKTERIJE *Mycoplasma neurolyticum***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jernej OBREZA

LASTNOSTI MEMBRANSKIH PROTEINOV BAKTERIJE
Mycoplasma neurolyticum

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

CHARACTERISTICS OF MEMBRANE PROTEINS OF *Mycoplasma*
neurolyticum

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2014

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

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Mojca Narat, za somentorico dr. Irena Oven, za recenzenta prof. dr. Tom Turk.

Mentorica: prof. dr. Mojca Narat

Somentorica: dr. Irena Oven

Recenzent: prof. dr. Tom Turk

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Alojz IHAN
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: dr. Irena OVEN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani Jernej Obreza se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga v elektronski obliki identična tiskani verziji.

Jernej OBREZA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.27.083:579.887(043)=163.6
KG	Mollicutes/ <i>Mycoplasma neurolyticum</i> /mikoplazme/hibridomna tehnologija/ monoklonska protitelesa/imunogeni proteini/molekularna imunologija
AV	OBREZA, Jernej
SA	NARAT, Mojca (mentorica)/OVEN, Irena (somentorica)/TURK, Tom (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2014
IN	LASTNOSTI MEMBRANSKIH PROTEINOV BAKTERIJE <i>Mycoplasma neurolyticum</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 46 str., 14 pregl., 5 sl., 82 vir.
IJ	sl
JI	sl/an
AI	<i>Mycoplasma neurolyticum</i> je patogena bakterija za miši in podgane, saj proizvaja zunajcelični toksin, ki povzroča nevrološke poškodbe in pogin teh živali. Poleg tega pa okužuje celične linije v raziskovalnih laboratorijih. S postopkom hibridomske tehnologije, v katerem je bila miš Balb/c imunizirana z <i>M. neurolyticum</i> , smo pridobili mešanico hibridomov. S presejalnim testom ELISA smo določili take hibridome, ki so proizvajali specifična protitelesa proti <i>M. neurolyticum</i> , nato smo jih klonirali. Pridobili smo tri stabilne in visoko produktivne klone iste družine 5F10, ki proizvajajo monoklonska protitelesa z močno afiniteto do membranskega proteina velikosti okoli 46 kDa. Klone smo gojili v rastnem mediju brez seruma (SFM), ki ni negativno vplivalo na rast in metabolizem le teh. Posredni imunoperoksidazni test (IIPA) je potrdil, da se ta protein nahaja na površini bakterije <i>M. neurolyticum</i> . Izmed 15 proteinov bakterije <i>M. neurolyticum</i> , ki so se ločili na 15 % akrilamidnem gelu, jih je 9 imunogenih za miš Balb/c. Ti proteini so velikosti 25, 33, 36, 46, 52, 58, 70, 75 in 85 kDa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 577.27.083:579.887(043)=163.6

CX Mollicutes/*Mycoplasma neurolyticum*/mycoplasmas/hybridoma technology/
monoclonal antibodies/immunogenic proteins/molecular immunology

AU OBREZA, Jernej

AA NARAT, Mojca (supervisor)/OVEN, Irena (co-advisor)/TURK, Tom
(reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

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

PY 2014

TI CHARACTERISTICS OF MEMBRANE PROTEINS OF *Mycoplasma
neurolyticum*

DT Graduation thesis (university studies)

NO IX, 46 p., 14 tab., 5 fig., 82 ref.

LA sl

AL sl/an

AB Bacteria *Mycoplasma neurolyticum* is recognised as pathogen in mice and rats. It produces an extracellular toxin that causes neurological damage and death of these animals. Moreover, it contaminates cell lines in research laboratories. With the use of the hybridoma technology process, where the Balb/c mouse was immunized with *M. neurolyticum*, we obtained a mixture of hybridoma cells. We used screening test ELISA to determine hybridomas which produced specific antibodies against *M. neurolyticum*, and then we cloned those hybridomas. We have obtained three stable and highly productive clones of the same family 5F10, which produce monoclonal antibodies with strong affinity for the membrane protein with a molecular mass of about 46 kDa. The clones were grown in a serum-free medium (SFM), which did not have a negative impact on their growth and metabolism. Indirect immunoperoxidase assay (IIPA) has confirmed that this protein is expressed on the surface of the bacterium *M. neurolyticum*. Out of 15 proteins of bacteria *M. neurolyticum* which were separated on a 15 % acrylamide gel, 9 are immunogenic for the Balb/c mouse. The molecular masses of these proteins are 25, 33, 36, 46, 52, 58, 70, 75 and 85 kDa.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 RAZRED MOLLICUTES.....	2
2.1.1 Taksonomija in filogenija	2
2.1.2 Genom.....	4
2.2 BAKTERIJE RODU <i>MYCOPLASMA</i>	5
2.2.1 Identifikacija bakterij rodu <i>Mycoplasma</i>	6
2.2.2 Pregled imunogenih membranskih proteinov v literaturi	7
2.3 <i>MYCOPLASMA NEUROLYTICUM</i>	9
2.3.1 Morfologija in fiziologija	10
2.3.2 Nevrotoksin	11
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 DELOVNA SHEMA	13
3.2 PRIPRAVA IN GOJENJE KLONOV	14
3.2.1 Imunizacija miške, fuzija celic in selekcija	14
3.2.2 Testi za dokazovanje protiteles	14
3.2.2.1 Test ELISA	14
3.2.2.2 Test DIBA	16
3.2.3 Kloniranje hibridomov	16
3.2.4 Gojenje klonov - proizvodnja monoklonskih protiteles.....	17
3.3 ČIŠČENJE IN KONCENTRIRANJE PROTITELES	18
3.3.1 Obarjanje protiteles z amonijevim sulfatom	18
3.4 LASTNOSTI PROTEINA.....	19
3.4.1 Elektroforeza SDS-PAGE.....	19
3.4.2 Elektroforski pufer	20

3.4.3	Priprava vzorcev za elektroforezo SDS-PAGE.....	20
3.4.4	Elektroforeza in pogoji.....	21
3.4.5	Barvanje in profiliranje membranskih proteinov	21
3.4.5.1	Barvanje z barvilom Commassie brilliant blue	21
3.4.5.2	Barvanje z barvilom Ponceau rdeče	22
3.4.6	Prenos po Westernu	22
3.4.7	Opredelitev lastnosti proteinov z monoklonskimi protitelesi	22
3.4.8	Pregled membranskih proteinov po internetni bazi.....	23
4	REZULTATI.....	24
4.1	SELEKCIJA HIBRIDOMOV	24
4.2	KLONIRANJE HIBRIDOMOV	25
4.3	DOLOČANJE SPECIFIČNIH KLONOV	25
4.4	RAST KLONOV V RASTNEM MEDIJU BREZ SERUMA.....	26
4.5	DOLOČANJE PRODUKTIVNOSTI KLONOV	27
4.6	DOLOČANJE TITRA KONCENTRIRANIH MONOKLONSKIH PROTITELES.....	28
4.7	PROFIL MEMBRANSKIH PROTEINOV <i>M. NEUROLYTICUM</i>	28
4.8	REZULTATI OPREDELITEV LASTNOSTI PROTEINA BAKTERIJE <i>M.</i> <i>NEUROLYTICUM</i>	29
4.9	PREGLED PROTEINOV PO INTERNETNI BAZI	31
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	33
5.1	RAZPRAVA.....	33
5.2	SKLEPI.....	36
6	POVZETEK.....	37
7	VIRI	38

KAZALO SLIK

Slika 1: Filogenetsko drevo taksonomske gruče <i>Mycoplasma neurolyticum</i> (The All-Species Living Tree Project, 2013)	4
Slika 2: Morfologija bakterije <i>M. neurolyticum</i> (Nelson in Lyons, 1965).....	11
Slika 3: Shematski prikaz poteka eksperimentalnega dela ter zaporedje encimsko imunskih testov v postopku	13
Slika 4: Profil proteinov bakterije <i>M. neurolyticum</i> na 15 % akrilamidnem gelu.....	29
Slika 5: Membrana PVDF z membranskimi proteini <i>M. neurolyticum</i> , po obdelavi z monoklonskimi protitelesi	30

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava substratnega pufra.....	15
Preglednica 2: Sestava ločevalnega gela	19
Preglednica 3: Sestava nalagalnega gela	20
Preglednica 4: Sestava elektroforetskega pufra.....	20
Preglednica 5: Test ELISA, za deset izbranih hibridomov	24
Preglednica 6: Uspešnost kloniranja na mikrotitrski plošči	25
Preglednica 7: Test ELISA klonov družine 5F10 na mikrotitrski plošči, teden dni po kloniranju	26
Preglednica 8: Odbrani kloni družine 5F10, na podlagi testa ELISA	26
Preglednica 9: Ocena rasti klonov v rastnem mediju brez seruma SFM.....	27
Preglednica 10: Test DIBA za določanje vsebnosti monoklonskih protiteles v izbranih vzorcih pred obarjanjem.....	27
Preglednica 11: Test DIBA za določanje vsebnosti monoklonskih protiteles v skoncentriranih supernatantih po obarjanju z amonijevim sulfatom	28
Preglednica 12: Specifičnost monoklonskih protiteles.....	30
Preglednica 13: Imunogeni membranski proteini nekaterih mikoplazem velikostnega razreda od 42 do 48 kDa	31
Preglednica 14: Membranski proteini velikostnega razreda od 42 do 50 kDa, iz proteinske banke (UniProt, 2013).....	32

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABTS	(2,2'- <u>azino</u> -di-(3- <u>etil</u> <u>benz</u> tiazol-6- <u>sulfonska</u> kislina))
APS	<u>amonijev</u> <u>per</u> sulfat
ATP	adenozin trifosfat (ang. <u>adenosine</u> <u>triphosphate</u>)
BSA	goveji serumski albumin (ang. <u>bovine</u> <u>serum</u> <u>albumin</u>)
CAPS	<i>N</i> - <u>ciklo</u> heksil-3- <u>aminopropansulfonska</u> kislina
DDH	<u>DNA</u> – <u>DNA</u> <u>hibridizacij</u>
DGGE	elektroforeza v denaturirajočem gradientu (ang. <u>denaturing</u> <u>gradient</u> <u>gel</u> <u>electrophoresis</u>)
DIBA	točkovni encimsko imunski test (ang. <u>dot</u> <u>immunob</u> inding <u>assay</u>)
DMEM	kemijsko definiran hranilni medij za gojenje sesalskih celičnih kultur (ang. <u>Dulbecco`s</u> <u>Modified</u> <u>Eagle`s</u> <u>Medium</u>)
ELISA	encimsko imunski test za dokazovanje specifičnih protiteles ali antigenov (ang. <u>enzyme-linked</u> <u>immunosorbent</u> <u>assay</u>)
FBS	fetalni goveji serum (ang. <u>fetal</u> <u>bovine</u> <u>serum</u>)
HAT	seleksijski medij za hibridomske celične linije, ki vsebuje <u>hipoksantin</u> - <u>aminopterin</u> - <u>timidin</u>
kDa	<u>kilodalton</u> , enota za atomske ali molekulske mase
NADH	<u>nikotinamid</u> <u>adenin</u> <u>dinukleotid</u>
NEAC	<u>neuraminidazna</u> <u>encimska</u> <u>aktivnost</u>
NS0	celična linija mišjih mielomskih celic
PAGE	<u>poliakrilamidna</u> <u>gelska</u> <u>elektroforeza</u>
PBS	fosfatni pufer (ang. <u>phosphate</u> <u>buffered</u> <u>saline</u>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. <u>polymerase</u> <u>chain</u> <u>reaction</u>)
PEG	<u>polietilen</u> <u>glikol</u>
PPLO	pleuropneumoniji podobni organizmi (ang. <u>pleuropneumonia-like</u> <u>organisms</u>)
PVDF	polivinil difluorid (ang. <u>polyvinyl</u> <u>difluoride</u>)
SDS	natrijev dodecil sulfat (ang. <u>sodium</u> <u>dodecyl</u> <u>sulfate</u>)
SFM	rastni medij brez seruma (ang. <u>serum</u> <u>free</u> <u>medium</u>)

1 UVOD

V razred Mollicutes uvrščamo najmanjše bakterije, z najmanjšim genomom, ki še premorejo lastni metabolizem in se lahko razmnožujejo brez gostiteljskega organizma. Razvile so se iz po Gramu pozitivnih bakterij, zaradi parazitskega načina življenja pa je prišlo med evolucijo do redukcije genoma. Od drugih bakterij se razlikujejo tudi po tem, da nimajo celične stene, temveč samo dvoslojno membrano.

Mikoplazme so komenzali ali paraziti evkariontov. So povzročitelji bolezni, zato je preučevanje mikoplazem pomembno tako z zdravstvenega kakor tudi z ekonomskega vidika. Mikoplazme pogosto okužujejo tudi celice v kulturah. Mikoplazme so vrstno in tkivno specifične, vendar pa jih lahko najdemo tudi v netipičnih gostiteljih.

Bakterija *Mycoplasma neurolyticum* je patogena za podgane in miši, s svojim zunajceličnim toksinom povzroča nevrološke poškodbe, natančneje poškodbe glialnih celic v možganih. Posledično se začne miš kotaliti oziroma vrteti okrog svoje daljše osi ter pogine. Okužba z bakterijo je lahko prisotna tudi latentno in ne povzroča nikakršnih težav. Prav zato je *M. neurolyticum* pomembno preučiti in poznati diagnostične metode.

1.1 NAMEN DELA

M. neurolyticum ima na svoji površini mnogo membranskih proteinov. Nekateri med njimi so imunogeni, nekateri pa imajo pomembno vlogo v patogenezi. V tem diplomskem delu smo predvideli, da bomo s hibridomsko tehnologijo pridobili monoklonska protitelesa za vsaj enega izmed imunogenih membranskih proteinov in ga opredelili. Ugotavljali bomo prisotnost in titre protiteles s pomočjo testov DIBA in ELISA. Monoklonska protitelesa so dobro orodje za preučevanje proteinov in diagnostiko. S pomočjo podatkov iz literature in proteinskih bank bomo skušali ugotoviti, za kakšne vrste proteinov gre.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAZRED Mollicutes

Predstavniki razreda Mollicutes («mollis» pomeni mehak, »cutis» pomeni koža) imajo skupne lastnosti, kot so majhen premer celic, odsotnost celične stene, reduciran genom in preproste metabolne poti. Natančnejše molekularne analize so pokazale, da so se te bakterije najverjetneje razvile z redukcijo genoma iz bolj običajnih gram pozitivnih bakterij z nizkim deležem baznih parov gvanina in citozina (G + C). Bakterije rodov *Mycoplasma* in *Ureaplasma* imajo od vseh bakterij najmanjši genom, ki obsega od 580 do 1400 kilobaznih parov. Zaradi te lastnosti jih uvrščajo med organizme z minimalnim genomom (Razin in sod., 1998; Peterson in Fraser, 2001). Za rast in razvoj potrebujejo zunanji vir sterola. Bakterije rodu *Ureaplasma* pa za rast potrebujejo še zunanji vir sečnine (Tully in sod., 1989). Od prej omenjenih rodov imajo bakterije rodov *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma*, *Spiroplasma* večji genom, in sicer v razponu od 1360 do 1830 kilobaznih parov. V gojišču brez dodanega sterola lahko rastejo le bakterije iz rodov *Acholeplasma*, *Asteroleplasma*. Rodova *Anaeroplasma* ter *Asteroleplasma* pa predstavljajo bakterije, ki so obligatni anaerobi in jih najdemo le v vampu krave in ovce (Robinson in sod., 1987).

Odsotnost celične stene je ključni razlog, da so ti mikroorganizmi odporni na penicilin in na antibiotike, ki preprečujejo sintezo celične stene. Pleomorfna morfologija in velikost celic od 0,2 do 0,8 μm jim omogoča, da prehajajo skozi sterilizacijske filtre s porami velikosti 0,2 μm . Bakterije razreda Mollicutes izoliramo iz tkiv najrazličnejših eukariotov, kot so sesalci, ptiči, ribe, insekti ter rastline (Razin in sod., 1998).

2.1.1 Taksonomija in filogenija

Na prvi pogled se zdi, da so bakterije razreda Mollicutes, zaradi svoje preproste biološke strukture, primitivni organizmi, iz katerih naj bi se pozneje skozi evolucijo razvili bolj kompleksni organizmi. Take domneve so se porajale ob odkritju teh mikroorganizmov. To idejo pa so opustili na podlagi raziskav Carla Woeseja in sod. (Woese in Fox, 1977; Woese in sod., 1980), ki so se ukvarjali s preučevanjem ribosomalne molekule rRNA, ter na podlagi sekvenciranja ribosomalne molekule 16S rRNA (Weisburg in sod., 1989; Johansson in sod., 2002).

V filogenetskem drevesu je razred Mollicutes danes uvrščen v domeno Bacteria, kot samostojna veja znotraj debla Firmicutes. Ločitev razreda Mollicutes od po Gramu

pozitivnih bakterij z nizkim deležem baznih parov G + C se je zgodila pred približno 600 milijoni let. Rekonstrukcija evolucije je pokazala, da se je pred 470 milijoni let razred Mollicutes razdelil v dve pomembni veji. To sta veja AAP, kamor uvrščamo rodove *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma* in *Phytoplasma*, ter veja SEM, kamor uvrščamo rodove *Spiroplasma*, *Mesoplasma*, *Ureaplasma* in *Mycoplasma*. Pri obeh skupinah je razvoj potekal neodvisno, v smeri drastične redukcije genoma in parazitizma (Woese, 1987; Razin in sod., 1998; Maniloff, 2002).

Sorodne veje razreda Mollicutes so razredi *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus* in *Clostridium* (Woese in sod., 1980). Po ločitvi veje Mollicutes je ta novonastali razred doživel hitro regresivno evolucijo, prav tako pa veliko genotipskih in fenotipskih variacij (Maniloff, 1992). Zaradi regresivne evolucije je od skupnega prednika razreda Mollicutes do danes bakterijam ostal nabor le od 580 do 2000 genov (Sirand-Pugnet in sod., 2007).

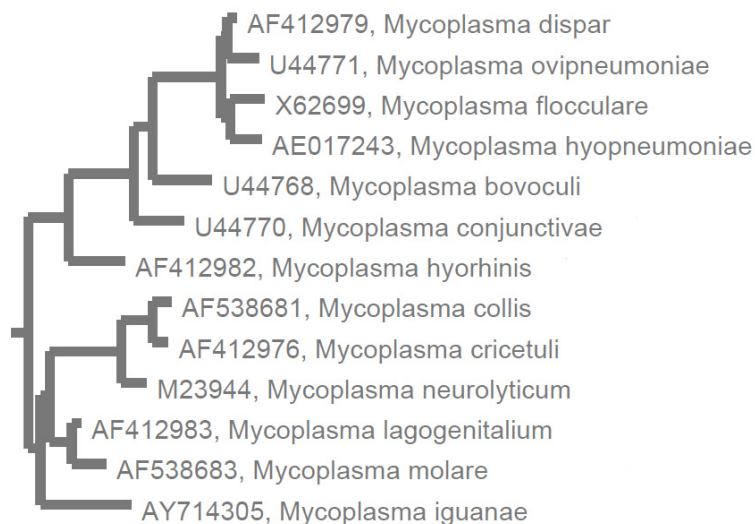
Filogenetsko so bakterije razreda Mollicutes, na podlagi analiz 16S rRNA, razporejene v pet glavnih taksonomskih skupin s taksonomskimi gruči:

- skupina hominis (*Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma lipophilum*, *Mycoplasma pulmonis*, *Mycoplasma neurolyticum*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma equigenitalium*, *Mycoplasma sualvi* ter *Mycoplasma synoviae*)
- skupina pneumoniae (*Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma muris*)
- skupina spiroplasma (predstavniki so *Mycoplasma mycoides*, *Spiroplasma citri*, *Spiroplasma apis*)
- skupina anaeroplasma (vsebuje bakterije iz rodov *Anaeroplasma* in *Acholeplasma*)
- skupina asteroplasma (vsebuje izolat vrste *Asteroplasma anaerobium*) (Weisburg in sod., 1989)

Skupina hominis se deli na osem taksonomskih gruči, ki so *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma equigenitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma lipophilum*, *Mycoplasma neurolyticum*, *Mycoplasma pulmonis*, *Mycoplasma sualvi* ter *Mycoplasma synoviae* (Chalker in Brownlie, 2004).

Taksonomsko gručo *Mycoplasma neurolyticum* pa sestavlja trinajst bakterij, ki so filogenetsko najbolj sorodne. To so *Mycoplasma bovoculi*, *Mycoplasma collis*, *Mycoplasma cricetuli*, *Mycoplasma conjunctivae*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinae*, *Mycoplasma iguanae*,

Mycoplasma lagogenitalium, *Mycoplasma molare*, *Mycoplasma neurolyticum*, in *Mycoplasma ovipneumoniae* (Ludwig in sod., 2010).



Slika 1: Filogenetsko drevo taksonomske gruče *Mycoplasma neurolyticum* (The All-Species Living Tree Project, 2013)

Po najnovejši veljavni kvalifikaciji spadajo bakterije razreda Mollicutes v deblo Tenericutes in so razvrščene v štiri redove s sedmimi družinami. Red Mycoplasmatales z družino Mycoplasmataceae (rodova *Mycoplasma*, *Ureaplasma*), ter družino Incertae sedis (rodova *Eperythrozoon* in *Heamobartonella*). Red Entomoplasmatales z družino Entomoplasmataceae (rodova *Entomoplasma* in *Mesoplasma*), ter družino Spiroplasmataceae (rod *Spiroplasma*). Red Acholeplasmatales z družino Acholeplasmataceae (rod *Acholeplasma*), ter družino *Incertae sedis* (rod "Candidatus Phytoplasma"). Red Anaeroplasmatales z družino *Anaeroplasmataceae* (rodova *Anaeroplasma* in *Asteroleplasma*) (Ludwig in sod., 2010).

2.1.2 Genom

Glede na filogenetski izvor vsebujejo bakterije razreda Mollicutes nizek delež baznih parov G + C. Najnižji delež 24 % ima bakterija *Mycoplasma capricolum*, najvišjega 40 % pa *Mycoplasma pneumoniae*. Srednja vrednost deleža pri mikoplazmah je okoli 28 % (Sirand-Pugnet in sod., 2007).

Vedno več je objav genomov bakterij iz razreda Mollicutes. Sekvenciranje genomov bakterij je pripomoglo k odkritju in preučevanju velikega števila proteinov ter njihovih funkcij, kot tudi do odkritja horizontalnega prenosa genov med določenimi vrstami.

Horizontalni prenos so potrdili med dvema patogenima bakterijama, ki okužujeta perutnino, to sta *M. gallisepticum* in *M. synoviae* (Vasconcelos in sod., 2005). Prav tako med *M. agalacticae* ter mikoplazmami gruče *M. mycoides*, ki okužujejo prežvekovalce. Horizontalni prenos očitno poteka med vrstami razreda Mollicutes, ki so lahko med seboj sicer filogenetsko oddaljene, vendar pa imajo skupnega gostitelja (Sirand-Pugnet in sod., 2007).

2.2 BAKTERIJE RODU *Mycoplasma*

Poimenovanje mycoplasma (»mykes« grško pomeni gliva, »plasma« pomeni oblika) sta leta 1950 prvič uporabila Edward in Freundt, namesto poimenovanja »pleuropneumoniji podoben organizem« (PPLO) (Edward in sod., 1956).

Bakterije rodu *Mycoplasma* se po Gramu barvajo negativno, kot posledica odsostnosti celične stene, čeprav so evolucijsko bližje po Gramu pozitivnim bakterijam. Najdemo jih v različnih okoljih, najpogosteje pa v gostiteljih, kot so človek, divje in domače živali, kjer lahko povzročajo bolezni. V gostiteljih so lahko prisotne tudi v subkliničnih fazah, brez znakov bolezni, zato se jih pri postavljanju diagnoze, pogosto spregleda. (Thompson in sod., 2011; Schnee in sod., 2012). Po veljavnih kriterijih vrste so do nedavno poznali 128 vrst in 4 podvrste rodu *Mycoplasma* (Gleim, 2013)

Mikoplazme so zunajcelični paraziti, lahko pa vstopijo v gostiteljeve celice, kjer se razmnožujejo in kjer lahko preživijo. Skozi evolucijo so mikoplazme razvile mehanizem mimikrije in se uspešno izmikajo gostiteljevemu imunskemu sistemu. Preživijo v fagocitirajočih in tudi nefagocitirajočih celicah (Razin in sod., 1998; Rottem, 2003).

Opredelitev lastnosti in identifikacija vrste znotraj rodu *Mycoplasma* sloni na običajnih postopkih, kot so serološke in fenotipske analize ali kombinacija analize genske sekvence 16S rRNA in DNA – DNA hibridizacije. V filogeniji in taksonomiji se je razlikovanje vrst znotraj rodu *Mycoplasma* s pomočjo metabolnih značilnosti izkazalo za omejeno in nezadostno. Vrste se razlikujejo glede na sposobnost fermentacije glukoze, hidrolize arginina in uree, ter od holesterola odvisne rasti celic in potrebah po kisiku. Te značilnosti pa ne določajo vrste. Za rodovno klasifikacijo je pomemben podatek, kje v celici se oksidira reducirana molekula nikotinamid adenin dinukleotid (NADH), na membrani ali v citoplazmi (Razin, 2006).

Mikoplazme lahko opredelimo kot fermentativne in nefermentativne, glede na to, kako producirajo ATP. Fermentativne mikoplazme producirajo ATP s fermentacijo ogljikovih

hidratov po glikolitični poti, nefermentativne pa producirajo ATP s hidrolizo arginina, po poti arginin-dihidrolaze. Nekatere mikoplazme pa uporabljajo obe poti (Razin, 1978; Razin in sod., 1998).

S hitrim sekvenciranjem genoma in avtomatskih analiz genoma se je pojavil nov vidik v taksonomiji rodu *Mycoplasma*. Hitro sekvenciranje omogoča tudi hitrejšo identifikacijo ter preučevanje evolucije teh bakterij (Coenye in Vandamme, 2004).

2.2.1 Identifikacija bakterij rodu *Mycoplasma*

Okužbe celičnih linij z mikoplazmami so zelo pogoste, vendar pa jih težko odkrijemo. To je povezano z dejstvom, da celične linije v laboratorijih niso dosledno testirane na okužbe z mikoplazmami. Različne raziskave so pokazale, da je bilo od 15 % do 80 % celičnih linij okuženih z mikoplazmami. Te okužbe ne povzročajo spremembe motnosti gojišča, ampak povzročajo celične spremembe, kot so sprememba metabolizma, genetike in rasti celičnih linij (Lehmann in sod., 2009).

Celične kulture najpogosteje okužujejo mikoplazme vrst *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma fermentas*, *Mycoplasma hyorhina*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma hominis* in *Acholeplasma laidlawii*. Te mikoplazme predstavljajo približno 95 % okužb celičnih kultur (Ossewaarde in sod., 1996; Tang in sod., 2000; Dvorakova in sod., 2005). Poleg teh pa so med kontaminanti dokazali še bakterijske vrste *Mycoplasma artritidis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pirum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma salivarium* ter *Mycoplasma neurolyticum* (Sung in sod., 2006).

Kljub številnim podatkom o razširjenosti okužb celičnih kultur z mikoplazmami, je potrjenih primerov relativno malo. To je delno posledica težavne diagnostike bakterij tega rodu, saj slabo rastejo na gojiščih, sestava gojitvenega medija pa je zelo kompleksna in specifična. Drug razlog je pomanjkanje ustreznih hitrih testov, ki bi bili dovolj občutljivi in specifični. Pri testiranju živali na okužbe z mikoplazmami se testira prisotnost glavnih in najbolj raziskanih vrst tega rodu, premalo pozornosti pa se posveča manj raziskanim ali netipičnim mikoplazmam (Schnee in sod., 2012). Mikoplazme niso strogo specifične za gostitelja, saj najdemo nekatere vrste izjemoma tudi v netipičnih gostiteljih (Pitcher in Nicholas, 2005; Benčina in sod., 2006).

Detekcija in diagnosticiranje mikoplazem z izolacijo in kultivacijo ne pride v poštev, saj je to najpočasnejša metoda, ki traja celo 28 dni in se zato v diagnostiki bolezni živali ne uporablja (Lehmann in sod., 2009). V diagnostiki je velik izziv identifikacija večjega

števila različnih vrst mikoplazem, ki so lahko prisotne v okuženih živalih. Testiranje zgolj s testom PCR ali ELISA je premalo za identifikacijo netipičnih vrst ali za dokazovanje koinfekcije z netipičnimi vrstami tega rodu. Kot uporabna metoda, za detekcijo in identifikacijo mešanih infekcij, se je izkazala kombinacija PCR ter gelske elektroforeze v denaturirajočem gradientu (DGGE). Izvedba metode je sicer zelo kompleksna in izvedljiva le v laboratorijskih razmerah. V splošnem velja, da je treba rezultate, pridobljene s PCR, dodatno potrditi s sekvenciranjem, restrikcijo ali hibridizacijo (McAuliffe in sod., 2005). Na drugi strani pa ponujajo testi z DNA mikročipi (mikromreže) za laboratorijsko diagnostiko vse več možnosti (Schnee in sod., 2012). Identifikacija bakterijskih vrst s PCR temelji na razlikah v nukleotidnih zaporedjih ohranjenih delov DNA ali rRNA, oziroma na genetskih markerjih. Kot genetski marker se je včasih uporabljal elongacijski faktor EF-Tu (gen *tuf* pri bakterijah rodu *Mycoplasma*) (Störmer in sod., 2009), danes pa se uporablja 16S ribosomalno RNA (16S rRNA) in 16S-24S rRNA medgenski distančnik (Spergser in Rosengarten, 2007).

Serologija je bila zelo pomembno orodje za določanje in identifikacijo bakterij rodu *Mycoplasma*. Običajne serološke metode za identifikacijo in dokazovanje določenih vrst mikoplazem so odvisne od nabora vrstno-specifičnih protiteles. Protitelesa niso vedno na voljo, rezultati testa pa tudi niso vselej zanesljivi (Spergser in Rosengarten, 2007). Nezanjektivost seroloških testov lahko med drugim pripišemo možnim navzkrižnim reakcijam mikoplazem različnih vrst s protitelesi proti preiskovani mikoplazmi. Bakterija *Mycoplasma neurolyticum* ima na membranskih proteinih določene epitope, ki jih najdemo na membranskih proteinih nekaterih drugih vrst rodu *Mycoplasma* (*Mycoplasma granularum*, *Mycoplasma pneumoniae*) (Kenny, 1969). Vendar pa je za identifikacijo in določanje vrste pomembno poznati vrstno specifične proteine, ki so stabilni in se izražajo tudi po več zaporednih pasajah. Eden izmed takih je 43 kDa velik membranski protein bakterije *M. hyopneumoniae* (Scarman in sod., 1997).

2.2.2 Pregled imunogenih membranskih proteinov v literaturi

Zaradi odsotnosti celične stene so površinski proteini na membranah mikoplazem neposredno izpostavljeni okolici. Ti proteini imajo pomembno vlogo pri interakciji z gostiteljem, pritrditvi, signaliziranju in mitogenezi. Poleg teh so prisotni še proteini, povezani s transportom hranil, membranski receptorji in nukleaze. Nekateri proteini so v membrano zasidrani bodisi z lipidi (lipoproteini) ali pa so to integralni proteini (Razin in sod., 1998; You in sod., 2006).

Lipoproteini mikoplazem igrajo pri poteku bolezni pomembno vlogo. Nekateri stimulirajo makrofage in inducirajo izločanje citokinov (Lavrič in sod., 2007). Nekateri igrajo pomembno vlogo pri izmikanju humoralnemu imunskemu sistemu, saj izražanje proteina variira glede na dolžino, zaradi variacij števila tandemnih ponovitev (Benčina in sod., 2001) in glede na fazo izražanja gena, ali izražanje le-tega poteka ali ne (Neyrolles in sod., 1999). Zaradi odsotnosti gena za N-acetiltransferazo so lipoproteini večinoma diacilirani (diacil glicerilni ostanek), brez maščobno kislinskega ostanka, vezanega na N-terminalni del cisteina, kot pri običajnih bakterijah. Lipoproteini z dvema vezanima maščobnima kislinama so bolj aktivni kakor tisti s tremi maščobnimi kislinama (Mühlradt in sod., 1997; Shimizu in sod., 2004).

Pri iskanju imunogenih proteinov smo se osredotočili na mikoplazme iz gruče *M. neurolyticum* in na patogene mikoplazme za podgane in miši. V gruči *M. neurolyticum* najdemo dvanajst vrst, ki so filogenetsko najbolj sorodne bakteriji *M. neurolyticum*. Izmed teh so najbolj preučene tri bakterije, *M. hyorhinae*, *M. hyopneumoniae* in *M. conjunctivae*.

Pri bakteriji *M. hyorhinae*, ki je patogena za prašiče, so s pomočjo monoklonskih protiteles dokazali 42 kDa velik protein. Pri različnih sevih *M. hyorhinae* niso opazili variacije glede izražanja tega proteina, kar kaže na njegovo ohranjenost (Bricker in sod., 1988). Pri omenjeni bakteriji so opisali tudi membranske proteine velikosti 23, 71 in 100 kDa (Boyer in Wise, 1989).

Bakterija *M. hyopneumoniae*, patogena za prašiče, ima imunogen membranski protein velikosti 46 kDa. Tega najdemo le pri tej bakteriji, torej je vrstno specifičen (Futo in sod., 1995). Poleg tega ima bakterija še imunogen protein velikosti 36 kDa (Strasser in sod., 1991) in adhezin velikosti 97 kDa (Okamba, 2007). Glavni imunogeni pa so še proteini velikosti 36, 43, 48, 52, 76, 78, 80, 82, 94, 106, 114 in 200 kDa (Scarman in sod., 1997).

Pri *M. conjunctivae*, ki povzroča bolezen keratokonjunktivitis pri gamsih, kozorogih in kozah, so ugotovili devet imunogenih površinskih proteinov. Proteini so velikosti 33, 36, 42, 50, 60, 68, 73, 83 ter 175 kDa. Testi seruma ovac, ki so jih namerno okužili z *M. conjunctivae*, so pokazali močno reakcijo na proteine z velikostjo 42, 60, 68, 83 in 175 kDa (Degiorgis in sod., 2000). Vendar pa dva proteina (42 in 83 kDa) navzkrižno reagirata z zajčjim imunskim serumom proti *Mycoplasma ovipneumoniae* (Belloy in sod., 2001).

Bakterija *Mycoplasma hominis*, ki sodi skupaj z *M. neurolyticum* v filogenetsko skupino *hominis* in sta torej daljna sorodnika, ima na svoji membrani protein velikosti 45 kDa, ki je eden izmed važnejših proteinov. Specifično protitelo za ta protein pa kaže močno

navzkrižno reaktivnost za membranske proteine velikosti od 42 do 48 kDa, ki jih najdemo pri drugih vrstah mikoplazem. Pri bakteriji *Mycoplasma fermentas* je to membranski protein velikosti 43 kDa (Sasaki, 1991).

Bakterija *M. arthritidis*, ki okužuje podgane, ima na svoji površini veliko proteinov, ki variirajo med različnimi sevi. Eden izmed izrazitih antigenov je velikosti 32 kDa, in antigen z zelo stabilno ekspresijo velikosti 43 kDa (Droesse in sod., 1995).

Pri bakteriji *M. pulmonis*, ki okužuje podgane in miši, so pridobili monoklonska protitelesa proti membranskemu kompleksu treh proteinov, velikosti 84, 90 in 103 kDa, ki inhibirajo mitogeno delovanje tega kompleksa (Lapidot in sod., 1995). Protein *M. pulmonis* MnuA, membranska nukleaza, je velik približno 42 kDa (Taylor in sod., 1999).

Še nekaj antigenov mikoplazem, ki so manj sorodne z *M. neurolyticum*, so izolirali iz treh sevov mikoplazem z oznakami 700, ULB-A in ULB-B. Te mikoplazme okužujejo kokoši. Na podlagi analize gena za 16S rRNA in analize genske sekvence *dnaK* teh treh sevov, so ugotovili sorodnost z vrsto *Mycoplasma capricolum*. Na svoji površini imajo štiri imunogene proteine velikosti 40, 50, 67 in 80 kDa (Benčina in sod., 2006).

Pri preučevanju enajstih različnih sevov *Mycoplasma bovis* so ugotovili visok odstotek podobnosti med proteinskimi profili. Podatki, pridobljeni s postopkom prenosa po Westernu so pokazali, da med različnimi sevi *M. bovis* ni enakega antigenskega profila. Le dva proteina sta prisotna pri vseh sevih te vrste. Proteina sta velikosti 45 in 41 kDa in manj imunogena (Rosengarten in sod., 1994).

Pri preučevanju bakterije *Mycoplasma synoviae* so odkrili protein VlhA. To je hemaglutinin, lipoprotein, ki ga bakterija izraža v velikih količinah in je glavni membranski imunogen. Med posttranslacijskim procesom se cepi na dva proteina, N-terminalni lipoprotein MSPB velikosti od 40 do 50 kDa ter C-terminalni fragment MSPA, velikosti od 50 do 55 kDa. Velikost proteinov med sevi je različna (Noormohammadi in sod., 1997; Benčina in sod., 1999; Lavrič in sod., 2007). Protein EF-Tu je velik okoli 43 kDa in nekatera monoklonska protitelesa ga prepoznajo pri številnih vrstah mikoplazem (Benčina in sod., 1999).

2.3 *Mycoplasma neurolyticum*

Bakterijo *M. neurolyticum* je leta 1938 prvi izoliral in opisal Sabin, med testiranjem vpliva toksoplazme na miške. Poimenoval jo je nevrotoksični, pleuropneumoniji podoben

organizem (PPLO) (Sabin, 1938a). Pri intravenozni inokulaciji miške z živimi bakterijami se pojavi v času od ene do treh ur sindrom »valeče miši« (rolling disease). Po treh do petih urah pa miš pogine (Sabin, 1938a, b, 1939b; Tully, 1964).

Bakterija *M. neurolyticum* izzove pri miših in podganah močno mitogeno delovanje na limfocite (Naot in sod., 1977). Mehanizem, s katerim *M. neurolyticum* izzove mitogenost, je drugačen kakor pri drugih mikoplazmah. Bakterija ima v membrani glikoprotein, na katerega je vezan monosaharidni derivat glukoze, N-acetilglukozamin. Ta monosaharid je mitogen za limfocite B, ne pa tudi za limfocite T (Naot in Ginsburg, 1978; Katz in sod., 1983).

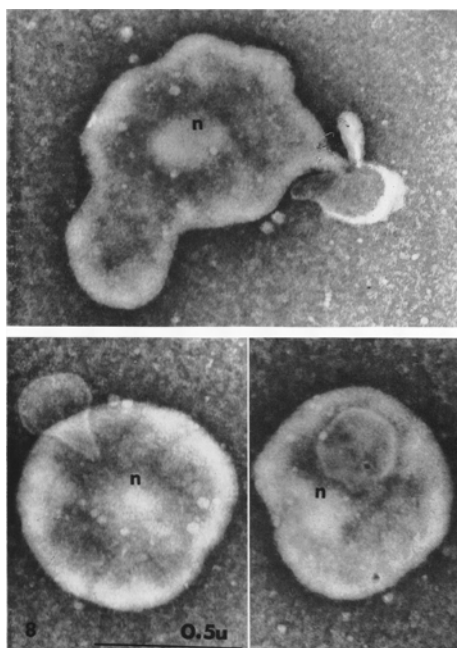
Iz podgan in miši so poleg bakterije *M. neurolyticum* izolirali še štiri druge mikoplazme, in sicer *M. pulmonis*, *M. arthritidis*, *Mycoplasma muris* in *Mycoplasma collis* (van Kuppeveld in sod., 1992). Dokazali so, da se *M. neurolyticum* lahko pojavi kot latentna okužba, vendar samo pri miših (Naot in sod., 1977).

2.3.1 Morfologija in fiziologija

Bakterija *M. neurolyticum* tvori zrnate kolonije. Vendar pa se videz kolonij spreminja glede na medij oziroma gojišče. Kolonije so po obliki okrogle, toda različnih velikosti. Nekatere so ločene nekatere pa združene. Med njimi se lahko pojavijo tanke povezave. Bakterijske celice so negibljive, sferične oblike, povprečen premer celic meri 0,7 μm (Nelson in Lyons., 1965).

Kvantitativna in kvalitativna sestava lipidnega dvoslija je podobna kot pri drugih mikoplazmah, ki imajo potrebo po sterolu. Lipidi, ki ločijo *M. neurolyticum* od ostalih mikoplazem so glikolipidi (Smith, 1972).

Optimalna rast bakterije *M. neurolyticum* je v alkalnem mediju, pri vrednosti pH 8. Nad pH vrednostjo 10 in pod 6 pa bakterija ne preživi (Hottle in Wright, 1966). Velike koncentracije penicilina v gojišču inhibirajo rast. Mesto delovanja penicilina je na površini celice. Bakterija je relativno odporna na ozmolizo (Wright, 1967).



Slika 2: Morfologija bakterije *M. neurolyticum* (Nelson in Lyons, 1965). V sredini celice je zgoščen dedni material, ki spominja na jedro (n), celična membrana pa tvori izvihke in pleomorfno obliko celice

Tekoče gojišče za rast *M. neurolyticum* je lahko sestavljeno iz osnove za tekoče gojišče Bacto PPLO, 10 % prašičjega seruma, 1 % glukoze, 0,25 % BME vitaminov ter 0,003 % fenol rdeče (Berčič in sod., 2012).

2.3.2 Nevrotoksin

Nevrotoksin, ki ga producira bakterija *M. neurolyticum*, je nestabilen, saj toksičnost izgine po 48 do 60 urah gojenja kulture v tekočem gojišču. Prav tako se v tem času zmanjša viabilnost kulture. Nevrotoksičnost se ohrani v zmrznjenih celičnih suspenzijah in filtratih. Prehaja skozi pore 100 μm , saj ima filtrat enak nevrotoksični učinek na miške kakor gojišče z bakterijsko kulturo, kar pomeni, da je toksin zunajceličen (eksotoksin). Toksin je nestabilen pri povišani temperaturi. Pri temperaturi 45 $^{\circ}\text{C}$ se toksin deaktivira po 70 do 90 minutah, pri temperaturi 50 $^{\circ}\text{C}$ pa že po 10 do 25 minutah (Tully, 1964).

Toksin ima molekulsko maso 200 kDa. Polovična letalna količina LD_{50} za miške je 3×10^8 celic *M. neurolyticum*. Aktiven je le, če ga injiciramo v veno. Pri vnosu toksina intracerebralno, intraperitonealno ali subkutano pa ne povzroči bolezenskega stanja, kar nakazuje, da je tarčni receptor za toksin povezan z vaskularnim sistemom centralnega živčnega sistema.

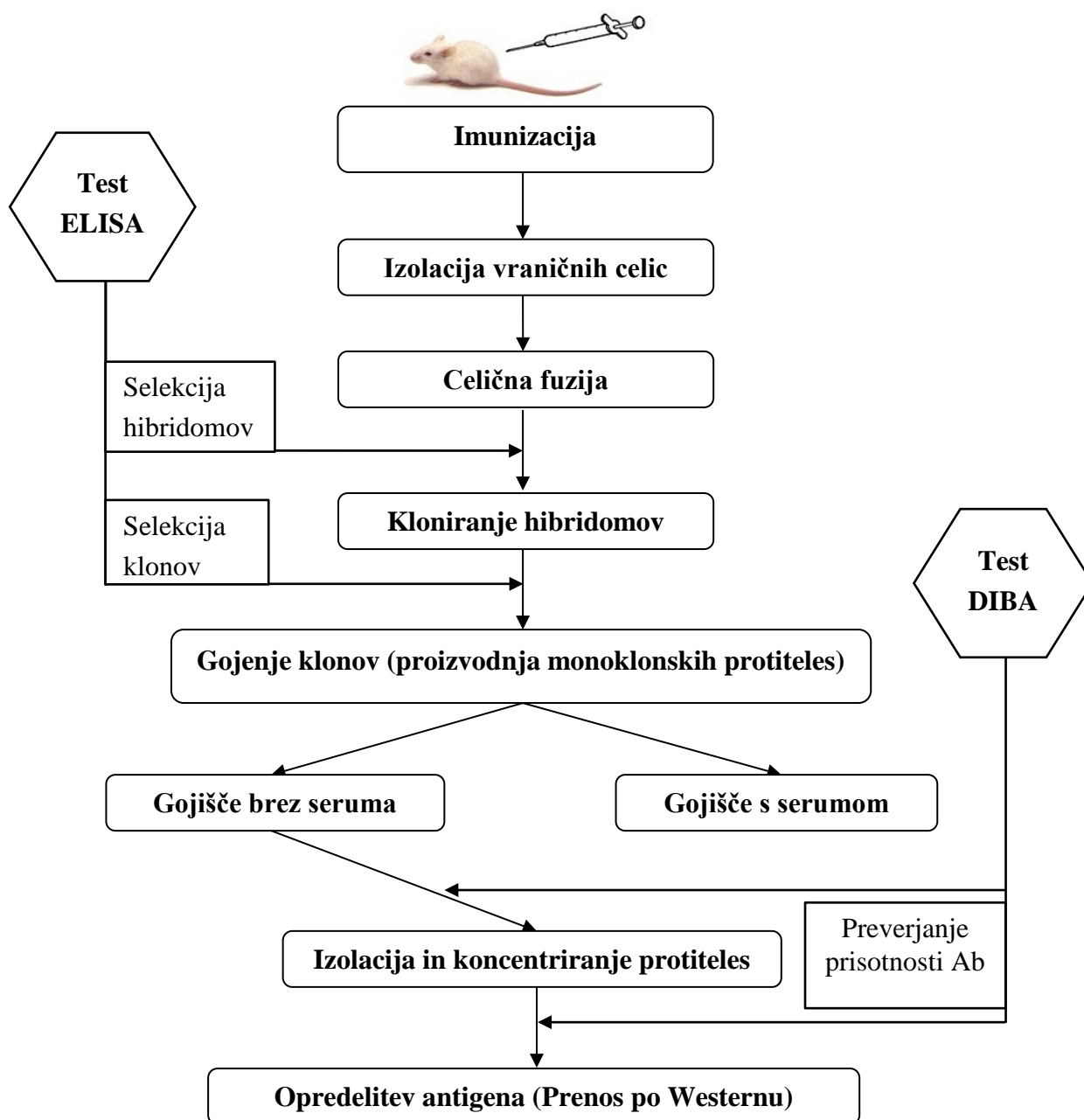
Nevrološki znaki se pri miših običajno pojavijo 30 do 60 minut po intravenoznem vnosu toksina. Prvi znaki zastrupitve so krči v mišicah glave in dvigovanje ene izmed sprednjih nožic. Čez nekaj minut se pojavi še vrtenje miške okoli daljše osi. Na začetku je vrtenje občasno, nato pa konstantno, z občasnimi vmesnimi obdobji s poskakovanjem ali hitrim tekom miši. Vrtenje traja od ene do dve uri, po tem obdobju pa postane miš negibna in nezavestna. Nekatere miši v tem obdobju poginejo, pri nekaterih pa se prej pojavijo še krčni napadi in toga hiperekstenzija sprednjih udov, nato tudi te kmalu poginejo. Večina miši pogine štirih urah po intravenoznem vnosu toksina (Thomas in sod., 1966a).

Mehanizem delovanja toksina je tak, da ima toksin visoko afiniteto do membranskih receptorjev celic glia v centralnem živčnem sistemu. Celice glia dajejo biokemijsko podporo endotelijskim celicam, ki predstavljajo bariero med krvnim obtokom in možgani. Interakcija med toksinom in receptorjem privede do spremembe celičnih membran in posledično do prepustnosti bariere, kar kažejo tudi nevropatološke študije možganskih poškodb. Zaradi prepustnosti bariere nabreknejo astrociti, ki so podvrsta celic glia. Že po nekaj urah od prejema toksina se začne v njih nabirati tekočina. Otekanje možganov in posledično lokalno pritiskanje na živčne celice, privede do prej opisanih nevroloških motenj. Vse to vodi v ireverzibilne poškodbe možganov, ishemične nekroze v povezavi z visoko stopnjo demielinacije, kar povzroči pogin miši (Thomas in sod., 1966a, 1966b).

Raziskave kažejo, da morda obstaja povezava med nevrotoksinom in encimom neuraminidazo (sialidazo), ki je virulenčni faktor nekaterih patogenov. Do sedaj so preiskali 96 bakterij vrste *Mycoplasma*, pri 13 vrstah pa so zaznali neuraminidazno encimsko aktivnost (NEAC). Potrdili so jo tudi pri *M. neurolyticum* (Tip A^T). Ko postane gojišče z *M. neurolyticum* kislo (pH < 7), pride do upada aktivnosti NEAC, kasneje pa dokončno izgine. Učinek NEAC se inaktivira pri 45 – 50 °C, starejše bakterijske kulture izgubijo NEAC. Tako nevrotoksina kakor tudi encimov, povezanih z NEAC, zaenkrat še ne poznamo. Vse pa kaže na povezavo med encimi NEAC in nevrotoksinom, ki povzroča »rolling disease« (Berčič in sod., 2012).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 DELOVNA SHEMA



Slika 3: Shematski prikaz poteka eksperimentalnega dela ter zaporedje encimsko imunskih testov v postopku

3.2 PRIPRAVA IN GOJENJE KLONOV

3.2.1 Imunizacija miške, fuzija celic in selekcija

Postopek pridobivanja monoklonskih protiteles smo opravili v laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko na Rodici. Začetek postopka so začeli pred našimi poskusi zato bomo le na kratko opisali potek pridobivanja hibridomskih celic po standardnem postopku, ki se rutinsko izvaja v celičnem laboratoriju (Galfre in Milstein, 1981).

Miško BALB/C so imunizirali intraperitonealno z bakterijo *M. neurolyticum* tip A (10^6 – 10^7 celic), v popolnem Freundovem adjuvantu (Sigma, ZDA). V presledkih po štirinajst dni so sledile tri »poživitvene« imunizacije. Dve z desetkrat manjšim številom bakterijskih celic v nepopolnem Freundovem adjuvansu, zadnja pa s samim antigenom *M. neurolyticum*. Tri dni po zadnji imunizaciji so odvzeli kri za testiranje stopnje imunskega odziva miške, nato pa so odvzeli še vranico.

Suspenzijo vraničnih celic so uporabili v postopku spojitve z mielomskimi celicami NS0. Fuzijo celic so izvedli po protokolu s polietilen glikolom (PEG, Sigma, ZDA), selekcijo pa v selekcijskem mediju hipoksantin-aminopterin-timidin (HAT, Sigma, ZDA) (Narat, 2004).

V dvanajstih dneh so se hibridomi namnožili do te mere, da so bili primerni za testiranje z encimsko-imunskim testom ELISA za specifične imunoglobuline IgG. Hibridome v luknjicah, ki so po rezultatih izkazovali največjo koncentracijo specifičnih protiteles, smo uporabili v nadaljnjem postopku kloniranja. Hibridome smo gojili v gojitvenem mediju DMEM (Sigma-Aldrich, ZDA) z 10 % FBS (HyClone, ZDA) ter 0,1 % gentamicina (Krka, Slovenija). Zaradi specifičnih pogojev rasti, smo hibridome gojili v CO₂ inkubatorju (Sanyo MC-17AC, Nemčija), na 37 °C, z 8 % CO₂.

3.2.2 Testi za dokazovanje protiteles

3.2.2.1 Test ELISA

S testom ELISA smo preverili prisotnost protiteles in na podlagi absorbance določili aktivnost hibridomov. Test smo izvedli v mikrotitrskih ploščah s 96 luknjicami (TPP, Švica). V vsako od 96 luknjic mikrotitrške plošče smo odpipetirali po 50 µl antigena (bakterija *M. neurolyticum*), ki smo ga prej redčili s pufrom PBS, do končne redčitve

1:3000. Inkubirali smo 4 ure na 37 °C. S tem se je antigen vezal na površino luknjic, nevezan antigen pa smo nato izpirali z 0,05 % pufrom Tween-PBS (TPBS) na avtomatskem spiralniku (Biotek, Lx-50, ZDA). Nezasedeno površino v luknjicah smo blokirali z govejim serumskim albuminom (BSA). Po 60 minutah inkubacije na 37 °C je sledilo izpiranje.

V luknjice smo nato odpipetirali po 50 µl supernatantov hibridomov iz mikrotitrskih plošč. Za pozitivno kontrolo smo uporabili mišji imunski serum z redčitvijo 1:100 v PBS. Za negativno kontrolo pa smo uporabili rastni medij DMEM + 10 % FBS ter raztopino PBS. Inkubirali smo čez noč, pri 4°C. Naslednji dan smo z avtomatskim spiralnikom iz luknjic sprali nevezana protitelesa.

Za sekundarna protitelesa smo uporabili kozja protitelesa IgG, specifična za mišje IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Sigma A9917, ZDA). V luknjice smo odpipetirali po 50 µl sekundarnih protiteles, redčenih v PBS v razmerju 1 : 60.000. Inkubirali smo 45 minut na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo nevezana kozja protitelesa ponovno spirali, in to dvakrat s pufrom 0,05 % TPBS ter tretjič samo s PBS.

V vsako luknjico smo dodali po 70 µl substrata in v temnem prostoru inkubirali 50 min. Za ustavitev reakcije smo v vsako luknjico odpipetirali po 25 µl 1 % natrijevega dodecil sulfata (SDS). Pri reakciji med hrenovo peroksidazo in substratom je nastal produkt, ki je raztopino obarval zeleno. Intenziteto barve in s tem premosorazmerno količino specifičnih protiteles v supernatantih smo merili z avtomatskim spektrofotometrom (Biotek, EL808) pri 405 nm.

Sestava substrata:

V 10 ml substratnega pufru (preglednica 1) smo raztopili tabletko ABTS (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazol-6-sulfonska kislina)) (Thermo Scientific, ZDA), ter dodali 20 µl 30 % vodikovega peroksida (Sigma-Aldrich, ZDA).

Preglednica 1: Sestava substratnega pufru

Spojina	Volumen
citronska kislina (0,1 M)	2,43 ml
dinatrijev fosfat (0,2 M)	2,57 ml
destilirana voda	5 ml

3.2.2.2 Test DIBA

Test DIBA smo izvedli, kot je opisano v literaturi (Benčina in sod., 2005). Uporabili smo polivinil difluoridno membrano (PVDF) (Millipore, ZDA). Na membrano smo narisali mrežo z ustreznim številom polj in jo narezali na trakove. Aktivirali smo jo v 100 % metanolu, nato pa za 5 minut namakali v destilirani vodi. Na rahlo osušeno membrano smo na določeno polje nanесли 2 μ l antigena (celic *M. neurolyticum*), v dveh redčitvah (1 : 50 in 1 : 100), in počakali, da se je antigen vpil v membrano. Nato smo jo za 45 minut namakali v 0,5 % Tween PBS in s tem blokirali nezasedena mesta na membrani. Vsak trak smo nato 60 minut inkubirali v svojem vzorcu supernatanta. Za pozitivno kontrolo smo uporabili mišji serum v razmerju 1 : 200, za negativno kontrolo pa rastni medij brez seruma (SFM – serum free medium), (HyClone, ZDA). Sledilo je spiranje nevezanih protiteles z 0,05 % Tween PBS, trikrat po 10 minut. Membrano smo inkubirali 45 min v raztopini sekundarnih protiteles (kunčja protitelesa proti mišjim IgG, konjugirana s peroksidazo), (Sigma A9044, ZDA), redčenih v razmerju 1 : 5000. Nevezana konjugirana protitelesa smo sprali dvakrat z 0,05 % Tween PBS, nato pa še enkrat s PBS. Trakove membrane smo postavili na ravno in suho površino ter nanесли substrat True Blue (KPL, ZDA). Pri pozitivnih reakcijah je nastala modra lisa. Reakcijo smo zaustavili z destilirano vodo. Po intenziteti barvne reakcije smo lahko sklepali o specifični vezavi antigen – protitelo ter o relativni koncentraciji protiteles v supernatantu.

3.2.3 Kloniranje hibridomov

Naš namen je bil, da pridobimo monoklonska protitelesa, zato smo morali iz suspenzije različnih hibridomov v mikrotitrskih ploščah pridobiti posamezne hibridome. Iz ene same hibridomske celice so se namnožili kloni, ki proizvajajo en tip protiteles z afiniteto do specifičnega antigena. Takim protitelesom pravimo monoklonska protitelesa. Kloniranje smo izvedli v mikrotitrskih ploščah s 96 luknjicami, po metodi razredčevanja do posameznih celic.

Na podlagi testa ELISA, ki smo ga izvedli 35 dni po fuziji, smo določili deset luknjic, z najvišjo absorbanco, oziroma z najvišjo koncentracijo protiteles. V vsaki od teh desetih luknjic smo nato s pomočjo Neubauerjeve šteвне komore določili koncentracijo živih celic.

Na podlagi določenih koncentracij celic smo suspenzijo vsake luknjice redčili do koncentracije 5 celic/ml s končnim volumnom 20 ml. Z večkanalno pipeto smo odpipetirali po 200 μ l redčine v vsako od 96 luknjic mikrotitrške plošče. Teoretično smo dobili eno

celico na luknjico. Celice smo gojili v DMEM, 10 % FBS ter 0,1 % antibiotika gentamicin na mikrotitrski plošči, vse skupaj v CO₂ inkubatorju (Sanyo MC-17AC, Nemčija), na 37 °C, z 8 % CO₂.

Z invertnim mikroskopom smo spremljali rast celic in deset dni po kloniranju določili luknjice z zgolj eno celično kolonijo, kjer so bile celice potomke enega samega hibridoma. Take celične kolonije smo resuspendirali in celice presadili v luknjice nove mikrotitrške plošče. Gojili smo jih, dokler niso povsem prerasle dna luknjic. Ponovno smo izvedli test ELISA in tako določili klone, ki so izkazovali visok titer monoklonskih protiteles in njihovo specifično vezavo na antigen. Izbrane klone smo prenesli v male gojitvene posode z 10 ml gojišča DMEM, 10 % FBS ter 0,1 % antibiotika gentamicin. Spremljali smo tudi barvo gojišča. Z izrabljanjem hranil in povečevanjem kislih stranskih produktov se je, zaradi pH indikatorja fenol rdeče, gojišče spremenilo iz ciklamno vijolične v rumeno ali oranžno barvo. Gojišče smo menjali na dva do tri dni.

3.2.4 Gojenje klonov - proizvodnja monoklonskih protiteles

Pri proizvodnji monoklonskih protiteles smo se želeli izogniti dejavnikom, ki bi motili poznejše analize. Zato je bil naš cilj gojiti klone v SFM (HyClone, ZDA), saj bi, v gojišču s serumom, proteini FBS lahko motili nadaljnji postopek pridobivanja in analize monoklonskih protiteles.

Najprej smo preverili uspešnost rasti klonov v rastnem mediju brez seruma SFM. Z mikroskopom Olympus CK2 smo opazovali fiziologijo celic. Po prirastu celic in spremembi barve gojišča smo sklepali o uspešnosti rasti celic v tem gojišču. Ker je bila rast pozitivna, smo jih presadili v 200 ml gojitvene posode, kamor smo dali po 20 ml SFM z 0,1 % gentamicina. Klone smo vzporedno gojili še v malih gojitvenih posodah s 6 ml gojišča DMEM, z 10 % FBS in 0,1 % gentamicinom.

Gojišče s serumom smo menjali na dva do tri dni, glede na barvo gojišča, ki je bila posledica že omenjene barvne reakcije s fenol rdečim, in glede na gostoto celic. Pred menjavo gojišča smo celice najprej resuspendirali, saj so bile posedene na dnu stene gojitvene posode. Iz posodic smo jih odpipetirali v označene centrifugirke in za 10 minut centrifugirali pri 900 obratih na minuto (onm), da so se celice posedle. Supernatant z monoklonskimi protitelesi smo odpipetirali v 30 ml stekleničke, jih označili in shranili v hladilnik na 4 °C, za poznejšo uporabo. Celice smo resuspendirali v 1 ml DMEM gojišča s serumom. Od tega smo jih približno eno četrtno odpipetirali nazaj v gojitvene posodice, v 5,5 ml svežega gojišča s serumom.

Prav tako smo ravnali pri klonih v gojišču brez seruma. Supernatant z monoklonskimi protitelesi smo odpipetirali v 30 ml stekleničke, jih označili in shranili v hladilnik (4 °C). Rast klonov v gojišču brez seruma se je sčasoma upočasnila. Kljub temu smo uspeli pridobiti zadostno količino monoklonskih protiteles za nadaljnjo uporabo. Vsebnost protiteles v mediju smo preverili s testom DIBA (poglavje 3.1.2.2).

3.3 ČIŠČENJE IN KONCENTRIRANJE PROTITELES

3.3.1 Obarjanje protiteles z amonijevim sulfatom

Protitelesa smo oborili z amonijevim sulfatom. Metodo smo izvajali po standardnem postopku (Kent, 1994).

Supernatante smo 15 minut centrifugirali pri 3000 obratih na minuto in nato prenesli v čaše, usedlino pa zavrgli. Hladno, 100 % nasičeno raztopino amonijevega sulfata, smo v supernatant dodajali po kapljicah in ves čas mešali z magnetnim mešalom. Končni volumen dodanega amonijevega sulfata je bil enak volumnu supernatanta, saj se mišji imunoglobulini oborijo med 45 in 50 % zasičenosti vzorca z amonijevim sulfatom. Raztopino smo čez noč pustili v hladilniku, na temperaturi 4 °C, da so se proteini do konca oborili.

Po končanem obarjanju smo epruvete z raztopinami centrifugirali 15 minut, pri 3000 obratih na minuto. Na stenah epruвет so se nabrala oborjena monoklonska protitelesa. Supernatantov nismo zavrgli, saj še nismo bili prepričani, če so v oborini dejansko protitelesa. To smo kasneje dokazali s testom DIBA. Supernatante smo prelili, vsakega v svojo 30 ml stekleničko, jih označili in shranili v hladilnik, na 4 °C. Vsako od oborin smo resuspendirali v 5 ml puferske raztopine PBS.

Za nadaljnjo uporabo, smo morali protitelesa razsoliti, da so bila zopet topna v vodi, in da so lahko aktivno vezala antigen. V postopku razsoljevanja in hkrati koncentriranja protiteles smo uporabili centrifugirke Macrosep (Macrosep Centrifugal Devices) z vgrajeno membrano (modificiran polietersulfon na polietilenskem substratu), ki prepušča le delce, manjše od 30 kDa.

Uporabljali smo centrifugo RC-5C (Sorval Instruments). Centrifugirali smo z rotorjem modela GSA, pri 5.800 obratih/m. Prvič 20 minut, nato pa smo za vsako naslednje centrifugiranje povečevali čas centrifugiranja za 10 minut, vse do 50 minut pri četrtem

centrifugiranju. Po vsakem centrifugiranju smo filtrat zavrgli, v zgornji razdelek centrifugirke pa dodali svež PBS, do prej določenega volumna. Pri četrtem centrifugiranju smo protitelesa resuspendirali, v 1,5 ml do 4 ml PBS. Tako smo zmanjšali volumen na desetino prvotnega volumna supernatanta.

3.4 LASTNOSTI PROTEINA

3.4.1 Elektroforeza SDS-PAGE

Da bi določili, za katere proteine bakterije *M. neurolyticum* so monoklonska protitelesa specifična, smo morali proteine najprej ločiti po velikosti. Izvedli smo elektroforezo v poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE). Ta postopek omogoča ločitev proteinov na podlagi različnih hitrosti potovanja skozi gel, kar je posledica različnih molekulskih mas oziroma dolžine proteinov (O'Farrell, 1975).

Za izvedbo elektroforeze smo uporabili enoto Mighty Small SE 245, Dual Gel Caster (Hofer, ZDA). V kalup za pripravo gela smo odpipetirali 10 ml mešanice sveže pripravljene, 15 % ločevalnega gela. Po eni uri polimerizacije smo na gel vlili mešanico 4 % nalagalnega gela, in vstavili glavnik, da so nastali žepki. Po uri in pol se je gel strdil in je bil pripravljen za nadaljnjo uporabo.

Preglednica 2: Sestava ločevalnega gela

SNOV	VOLUMEN
H ₂ O	2,3 ml
30 % AKRILAMID MIX	5,0 ml (povsem na koncu)
1,5 M Tris (pH 6,8)	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml
10 % APS	0,1 ml
TEMED	0,004 ml (pred akrilamidom)

Pri zaporednem dodajanju snovi v mešanico za gel je pomembno, da je predzadnja dodana snov TEMED, zadnja pa 30 % akrilamid mix.

Preglednica 3: Sestava nalagalnega gela

SNOV	VOLUMEN
H ₂ O	2,3 ml
30 % AKRILAMID MIX	0,83 ml (povsem na koncu)
1,5 M Tris (pH 6,8)	1,26 ml
10 % SDS	0,05 ml
10 % APS	0,05 ml
TEMED	0,005 ml (pred akrilamidom)

3.4.2 Elektroforetski pufer

Za pripravo 1000 ml elektroforetskega pufera za 15 % akrilamidni gel potrebujemo sestavine, ki so napisane v preglednici 4.

Preglednica 4: Sestava elektroforetskega pufera

SNOV	MASA / VOLUMEN
TRIZMA Base	3 g
Glicin	14,4 g
SDS	1 g (pri tehtanju zaščiti dihala)
mili Q voda	dopolniš do 1000 ml

3.4.3 Priprava vzorcev za elektroforezo SDS-PAGE

Vzorec, pripravljen iz bakterije *M. neurolyticum*, smo nanesti na elektroforetski gel. Končni volumen vzorca nalagalnega pufera in proteinskega vzorca je znašal 200 μ l. Iz izhodnega vzorca proteinov *M. neurolyticum*, ki je bil pripravljen v pufru PBS v razmerju 1:1, smo v mikrocentrifugirki pripravili 100 μ l redčenega vzorca v razmerju 1:20, dobro premešali in odpipetirali v mikrocentrifugirko.

V drugi mikrocentrifugirki smo pripravili 1 ml nalagalnega pufera. V čašo smo odpipetirali 0,125 ml 0,5 M Tris HCl; 0,1 ml glicerola (100 %); 0,2 ml SDS (10 %); 0,05 ml β -merkaptetoanola; 0,025 ml barvila bromfenol modro (0,25 %) ter dopolnili do 1 ml z vodo miliQ.

V mikrocentrifugirko z antigenom smo odpipetirali 100 μ l nalagalnega pufra. Končno razmerje antigena v nalagalnem pufu je bilo 1:40. Vzorce smo pred nanosom na gel inkubirali za 10 minut na 80 °C. Na gelu smo v prvi žepek dali 10 μ l markerja (Page Ruler, unstained protein ladder # SM0661), v naslednji, skupni žep, pa smo dali 200 μ l nalagalnega pufra z vzorcem.

3.4.4 Elektroforeza in pogoji

Proteini v vzorcu so se s pomočjo električnega toka ločili po velikosti. Kalup z gelom smo vertikalno vstavili in pričvrstili v enoto za elektroforezo. Enoto smo priklopili na vir enosmernega toka, tako da je bila negativna katoda v stiku z zgornjim delom gela, pozitivna anoda pa s spodnjim. Negativno nabiti proteini so tako potovali po gelu navzdol, proti katodi. Za potovanje proteinov po nalagalnem gelu smo naravnali tok na 20 mA. Spremljali smo premikanje modre črte spojine bromofenol modrega po gelu. Ko je ta po uri in pol prešel na ločevalni gel, smo električni tok povečali na 30 mA za 2 do 3 ure, oziroma dokler ni modra črta dosegla spodnjega roba gela. Gel smo uporabili v naslednjem postopku prenosa proteinov na membrano PVDF (Millipore, ZDA).

3.4.5 Barvanje in profiliranje membranskih proteinov

Da bi videli uspešnost elektroforeze in prenosa proteinov na membrano PVDF (Millipore, ZDA), smo gel barvali z barvilom Coomassie brilliant blue R-250 (Pharmacia, ZDA), membrano pa reverzibilno z barvilom Ponceau S rdeče (Sigma, ZDA). S tem smo dobili viden profil proteinov bakterije *M. neurolyticum*.

3.4.5.1 Barvanje z barvilom Coomassie brilliant blue

Po končanem postopku elektroforeze smo gel položili v banjico in ga prelili z raztopino za barvanje. Za pripravo 500 ml raztopine smo v erlenmajerico zamešali 0,5 g 0,1 % Coomassie blue G-250; 40 ml 8 % metanola; 35 ml 7 % očetne kisline; z deionizirano vodo dopolnili do 500 ml. Tako smo gel barvali dve uri.

Gel smo razbarvali z raztopino, ki smo jo pripravili iz 437,5 ml dH₂O, 25 ml 100 % metanola z očetno kislino do 7,5 % (v/v) končne koncentracije. Razbarvanje je potekalo čez noč.

3.4.5.2 Barvanje z barvilom Ponceau rdeče

Z barvilom Ponceau S rdeče (Sigma, ZDA) smo barvali proteine na membrani PVDF, da smo videli, če je bil prenos proteinov po Westernu na membrano uspešen. V posodico primerne velikosti smo položili membrano in prelili z raztopino z 1 % deležem očetne kisline ter 0,2 % deležem barvila Ponceau S. Barvanje je trajalo pet minut. Razbarvanje membrane je potekalo v deionizirani vodi.

3.4.6 Prenos po Westernu

Pri postopku prenosa po Westernu smo s pomočjo električnega toka prenesli proteine iz poliakrilamidnega gela na membrano PVDF.

Za izvedbo postopka, oziroma za prenos proteinov iz SDS – poliakrilnega gela na membrano PVDF, smo potrebovali pufersko raztopino EBP. Za pripravo tega pufra smo najprej pripravili pufersko raztopino CAPS. Za pripravo 10-kratne založne raztopine CAPS smo natehtali 22,13 g CAPS (Sigma-Aldrich, ZDA), to raztopili v 900 ml deionizirane H₂O, titrirali z NaOH do pH 11, ter dopolnili volumen z deionizirano H₂O do volumna 1 litra. Pufer EBP pa je raztopina 10 mM CAPS v 10 % metanolu.

Štiri filtrske papirje, velikosti gela, smo položili na anodno ploščo enote za elektroprenos. Na to plast smo položili aktivirano membrano PVDF, na membrano smo položili gel in na vrh še štiri filtrske papirje. Poprej smo vse te elemente namočili v EBP. Na tako sestavljen »sendvič« smo poveznili katodni pokrov. Enoto za elektroprenos smo priključili na vir enosmernega električnega toka. Količino toka smo nastavili in fiksirali glede na površino gela po enačbi:

$$0,8 \text{ mA/cm}^2 * S \text{ (površina gela)}$$

Proces smo pustili teči eno uro. Po končanem procesu smo membrano reverzibilno barvali s Ponceau rdečim barvilom, ter nato razbarvali z namakanjem v destilirani vodi. Pas membrane, kamor se je prenesel marker, smo odrezali in barvali z barvilom Coomassie modro.

3.4.7 Opredelitev lastnosti proteinov z monoklonskimi protitelesi

Po prenosu proteinov iz gela na membrano, smo membrano tretirali, kot po postopku testa DIBA. Narezali smo jo na šest trakov. Vsakega od treh trakov smo izpostavili svojemu koncentratu monoklonskih protiteles. Enega od preostalih smo obdelali s pufrom PBS, kar

nam je bila negativna kontrola. Drugega smo obdelali z imunskim serumom, kar je bila pozitivna kontrola. Tretji trak pa smo barvali s Coomassie modrim. S tem postopkom smo ugotovili, proti katerim proteinom bakterije *M. neurolyticum* smo pridobili monoklonska protitelesa.

3.4.8 Pregled membranskih proteinov po internetni bazi

Pregled imunogenih proteinov, velikih okoli 46 kDa smo preverili v literaturi (poglavje 2.2.2). S pomočjo proteinske baze podatkov UniProtKB, ki v 98 % vsebuje proteinske sekvence, pridobljene s translacijo kodirajočih sekvenc, smo preiskali možne proteine. Pri analizi podatkov smo upoštevali dejstvo, da iščemo membranske proteine in lipoproteine, ki so velikosti okoli 46 kDa, torej proteine velikosti 40 do 50 kDa. Pri tem smo upoštevali tudi podatke iz genskih sekvenc o morebitnih še neodkritih proteinih, ter preverili, v kakšno skupino proteinov bi lahko sodili po sorodnih frekvencah. Zaradi premalo podatkov in slabe preučnosti bakterije *M. neurolyticum* smo proteine iskali med sorodnimi bakterijami iz gruč *M. neurolyticum*, za katere obstaja več podatkov.

4 REZULTATI

4.1 SELEKCIJA HIBRIDOMOV

Po fuziji celic smo v supernatantih preverjali in spremljali prisotnost specifičnih protiteles. Prvi presejalni test ELISA smo naredili sedem dni po fuziji, za supernatante v vseh luknjicah na petih mikrotitrskih ploščah. Izvedli smo prvo selekcijo, glede na to, kako visok je bil titer specifičnih protiteles v supernatantih. Izbrali smo 10 luknjic s hibridomi (Preglednica 5).

Osemnajst ter štiriintrideset dni po fuziji smo izpeljali še drugi in tretji test. Spremljali smo morebitne spremembe in odstopanja od prejšnjih rezultatov, zaradi morebitnega prenehanja sinteze protiteles oziroma izgube aktivnosti. Iskali smo najvišje titre protiteles v supernatantih. Za pozitivno kontrolo smo uporabili imunski serum, za negativno pa sveže gojišče DMEM z 10 % FBS in 0,1 % gentamicinom.

Preglednica 5: Test ELISA, za deset izbranih hibridomov

Oznaka hibridomov	Absorbance 7 dni po fuziji	Absorbance 18 dni po fuziji	Absorbance 34 dni po fuziji	Vrednotenje
5F10	0,089	0,086	0,411	+++
4F5	0,061	0,039	0,094	+++
3H4	0,072	0,097	0,195	+++
3G8	0,065	0,049	0,051	++
3F1	0,062	0,041	0,046	++
5G6	0,060	0,043	0,046	++
3A2	0,070	0,026	0,027	+
3G9	0,059	0,021	0,023	+
3H11	0,060	0,023	0,026	+
5F7	0,063	0,022	0,039	+
pozit. kontr.*		0,244	0,208	
negat. kontr.*		0,021	0,020	

* Za pozitivno kontrolo smo uporabili mišji serum, za negativno kontrolo pa gojišče;

Absorbance so bile merjene pri 405 nm valovne dolžine

Iz rezultatov v preglednici (Preglednica 5) je razvidno, da je v supernatantih nekaterih hibridomov sčasoma upadla koncentracija specifičnih protiteles, nekateri hibridomi pa so ohranili visoko stabilnost in sposobnost tvorbe protiteles specifičnih za membranske proteine bakterije *M. neurolyticum*. Najvišjo izmerjeno absorbanco oziroma najvišji titer specifičnih protiteles so dajali hibridomi iz luknjic z oznako 5F10, 4F5, 3H4, nižja

absorbanco smo izmerili pri hibridomih iz luknjic 3G8, 3F1 ter 5G6, zelo nizka absorbanca, ki je bila podobna absorbanci negativne kontrole, pa je bila izmerjena pri hibridomih iz luknjic z oznako 3A2, 3G9, 3H11 ter 5F7.

4.2 KLONIRANJE HIBRIDOMOV

Po štiriintridesetih dneh od fuzije smo izbrali hibridome za kloniranje. Po najboljših rezultatih testa ELISA, smo izbrali hibridome z oznako 5F10. Deset dni po kloniranju smo izmed 96 luknjic določili 31 takih, kjer so zrasle celične kolonije, ki so bile potomke ene same celice. Klonom smo dodali oznake glede na položaj na mikrotitrski plošči. Tako smo dobili klone 5F10/A6, 5F10/A7, 5F10/A8, 5F10/A12, 5F10/B3, 5F10/B4, 5F10/B7, 5F10/B11, 5F10/C6, 5F10/C10, 5F10/C11, 5F10/C12, 5F10/D2, 5F10/D4, 5F10/D8, 5F10/E5, 5F10/E8, 5F10/E9, 5F10/E12, 5F10/F1, 5F10/F10, 5F10/F11, 5F10/G2, 5F10/G3, 5F10/G7, 5F10/G8, 5F10/G10, 5F10/G11, 5F10/H1, 5F10/H7 in 5F10/H8. Nadalje smo ugotavljali njihovo specifičnost.

Preglednica 6: Uspešnost kloniranja na mikrotitrski plošči

Pozicije	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	x	x	x	x	2	1	1	1	2	2	x	1
B	x	2	1	1	2	2	1	2	3	x	1	2
C	x	x	x	2	2	1	2	3	x	1	1	1
D	2	1	3	1	3	x	2	1	2	2	2	2
E	2	x	2	3	1	2	2	1	1	2	2	1
F	1	2	2	2	2	x	3	2	x	1	1	x
G	x	1	1	3	3	2	1	1	1	x	1	2
H	1	4	2	2	2	x	1	1	2	2	2	2

Opomba:

x - pozicije na mikrotitrski plošči, kjer ni bilo nobene kolonije celic

Številke – število kolonij na določeni poziciji

4.3 DOLOČANJE SPECIFIČNIH KLONOV

Izmed pridobljenih klonov smo s testom ELISA določili tiste, ki proizvajajo specifična protitelesa za proteine bakterije *M. neurolyticum*. Od teh smo izbrali tri take, ki so imeli najvišjo absorbanco, iz česar smo sklepali na visoko proizvodnjo specifičnih monoklonskih protiteles.

Preglednica 7: Test ELISA klonov družine 5F10 na mikrotitrski plošči, teden dni po kloniranju

Klon	5F10/A6	5F10/A7	5F10/A8	5F10/A12	5F10/B3	5F10/B4	5F10/B7	5F10/B11
Absorbanca	0,027	0,022	0,021	0,104	0,026	0,050	0,060	0,024
Klon	5F10/C6	5F10/C10	5F10/C11	5F10/C12	5F10/D2	5F10/D4	5F10/D8	5F10/E5
Absorbanca	0,075	0,081	0,028	0,022	0,063	0,051	0,071	0,025
Klon	5F10/E8	5F10/E9	5F10/E12	5F10/F1	5F10/F10	5F10/F11	5F10/G2	5F10/G3
Absorbanca	0,021	0,021	0,021	0,051	0,065	0,095	0,062	0,024
Klon	5F10/G7	5F10/G8	5F10/G10	5F10/G11	5F10/H1	5F10/H7	5F10/H8	
Absorbanca	0,019	0,065	0,022	0,071	0,020	0,032	0,058	
Kontrola	GOJ	IS						
Absorbanca	0,019	0,090						

Opombe:

GOJ – Negativna kontrola je gojišče DMEM z 10 % FBS in 0,1 % gentamicinom

IS – imunski serum, kot pozitivna kontrola

Pri devetnajstih klonih smo ugotovili zelo nizke titre protiteles, ki so imeli nižje absorbance od trikratne vrednosti absorbance negativne kontrole. Devet klonov je imelo absorbanco manjšo od štirikratne vrednosti negativne kontrole. Pri treh klonih pa smo ugotovili zelo visoke absorbance.

Preglednica 8: Odrani kloni družine 5F10, na podlagi testa ELISA

Oznaka klona	Rezultati testa ELISA
5F10/A12	0,104
5F10/C10	0,081
5F10/F11	0,095
gojišče	0,019
Imun. serum	0,090

Nekateri titri protiteles družine klonov 5F10 so bili zelo visoki že v mešanici hibridomov, kjer so nakazovali na stabilnost, ter konstantno in visoko proizvodnjo specifičnih protiteles. S tem testom pa smo le še potrdili domneve.

4.4 RAST KLONOV V RASTNEM MEDIJU BREZ SERUMA

Testirali smo, kakšna je rast klonov v ravnem mediju brez seruma, SFM (HyClone, ZDA). Klone smo gojili v gojišču SFM in jih presajali vsake tri dni. Medtem smo ves čas z mikroskopom spremljali njihovo rast. Na podlagi spremembe barve gojišča iz rožnate v rumeno smo sklepali na dobro metabolno aktivnost klonov v danem gojišču.

Preglednica 9: Ocena rasti klonov v rastnem mediju brez seruma SFM

Oznaka klona	Ocena rasti v SFM
5F10/A12	++
5F10/C10	+++
5F10/F11	+++

Pri opazovanju fiziologije celic nismo zaznali nobenih posebnosti, ki bi nakazovale na to, da bi bile izpostavljene šoku zaradi gojišča. Na podlagi vizualne ocene prirasta celic, v roku treh dni, smo sklepali, da kloni družine 5F10 v tem gojišču dobro rastejo. Ti kloni so še enkrat pokazali, da so stabilni.

4.5 DOLOČANJE PRODUKTIVNOSTI KLONOV

Med gojenjem klonov v gojitvenih posodah smo s testom DIBA preverjali sposobnost produkcije monoklonskih protiteles. Na podlagi intenzitete barvne reakcije na membrani testa DIBA smo določali relativno količino monoklonskih protiteles v gojitvenih posodah in posledično sklepali na produktivnost klonov.

Pri kvantifikaciji smo za oceno uporabili znake, in sicer pluse in minuse. Močno barvno reakcijo pri testu smo v razpredelnici označili s tremi plusi, zelo šibko reakcijo pa z enim. Če reakcije ni bilo, pa smo označili z minusom. Za oceno afinitete protiteles smo vzeli dve različni redčini antigena (bakterijo *M. neurolyticum*) 1:30 in 1:100, po 2 µl na testno polje.

Preglednica 10: Test DIBA za določanje vsebnosti monoklonskih protiteles v izbranih vzorcih pred obarjanjem

	aktivnost protiteles v serumskem gojišču		aktivnost protiteles v gojišču brez seruma	
	redčitev Ag (1:30)	redčitev Ag (1:100)	redčitev Ag (1:30)	redčitev Ag (1:100)
5F10/A12	+++	+++	++	++
5F10/C10	+	+++	+++	+++
5F10/F11	+++	+++	+++	+++
SF	-	-	-	-
FBS	-	-	-	-
PBS	-	-	-	-
IS	+++	+++	+++	+++

Opombe:

Za pozitivno kontrolo smo uporabili mišji imunski serum, za negativno kontrolo pa gojišče SFM, pufer PBS ter serum FBS

Test je pokazal dobro produkcijo monoklonskih protiteles pri vseh klonih. Rezultati testiranih vzorcev družine klonov 5F10 so bili v serumskem gojišču in tudi v gojišču brez

seruma zelo dobri. Kot smo ugotovili že pri testiranju klonov na rast v gojišču brez seruma (Preglednica 10), z malce slabšimi rezultati odstopajo le kloni 5F10/A12.

4.6 DOLOČANJE TITRA KONCENTRIRANIH MONOKLONSKIH PROTITELES

Po končanem postopku obarjanja in razsoljevanja protiteles z amonijevim sulfatom smo s testom DIBA preverili, ali so se protitelesa resnično oborila ali pa so ostala aktivna. Obarjali smo protitelesa iz gojišča s serumom, kot tudi protitelesa iz gojišča brez seruma. Pred testiranjem smo vzorce (koncentrate) ustrezno redčili. Vzorec protiteles smo redčili v razmerju 1:100, antigene pa v razmerju 1:50.

Glede na imunski serum so bili rezultati testa DIBA po obarjanju slabši, ker smo skoncentrirana protitelesa redčili. Je pa mogoče, da smo nekaj protiteles izgubili med samim postopkom obarjanja.

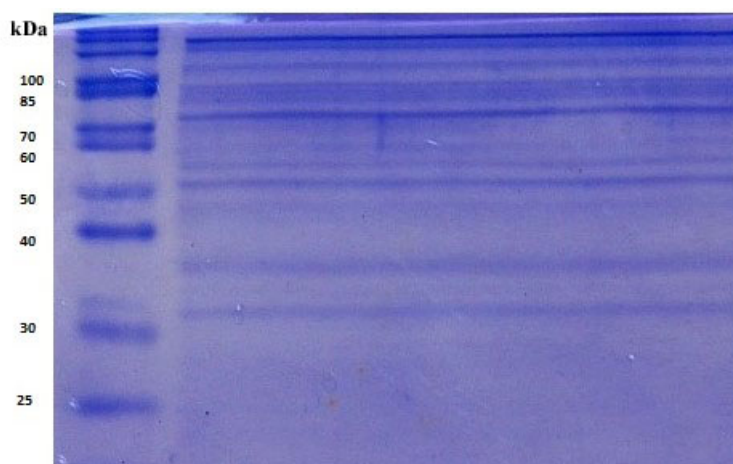
Za pozitivno kontrolo smo uporabili imunski serum, za negativno pa gojišče DMEM + 10 % FBS. Pozitivna kontrola je pokazala močno pozitiven rezultat. Negativna kontrola je dala rahlo pozitiven rezultat, iz česar lahko sklepamo, da je prišlo do nespecifične reakcije protiteles ali celo do eksperimentalne napake. Pozitiven rezultat predstavljajo le reakcije, ki so močnejše od reakcije negativne kontrole.

Preglednica 11: Test DIBA za določanje vsebnosti monoklonskih protiteles v skoncentriranih supernatantih po obarjanju z amonijevim sulfatom

	Redčitev protiteles 1:100	
	aktivnost protiteles v serumskem gojišču	aktivnost protiteles v gojišču brez seruma
	redčitev Ag (1:50)	redčitev Ag (1:50)
5F10/A12	++	+++
5F10/C10	++	++
5F10/F11	++	++
gojišče	+	
imun. serum	+++	

4.7 PROFIL MEMBRANSKIH PROTEINOV *M. neurolyticum*

Po končanem postopku elektroforeze smo gel najprej reverzibilno barvali z barvilom Coomassie modro. Tako smo se prepričali, da je elektroforeza uspela. Prav tako smo se po prenosu po Westernu prepričali, da je prenos na membrano uspel. S tem pa smo dobili tudi profil proteinov bakterije *M. neurolyticum*.



Slika 4: Profil proteinov bakterije *M. neurolyticum* na 15 % akrilamidnem gelu

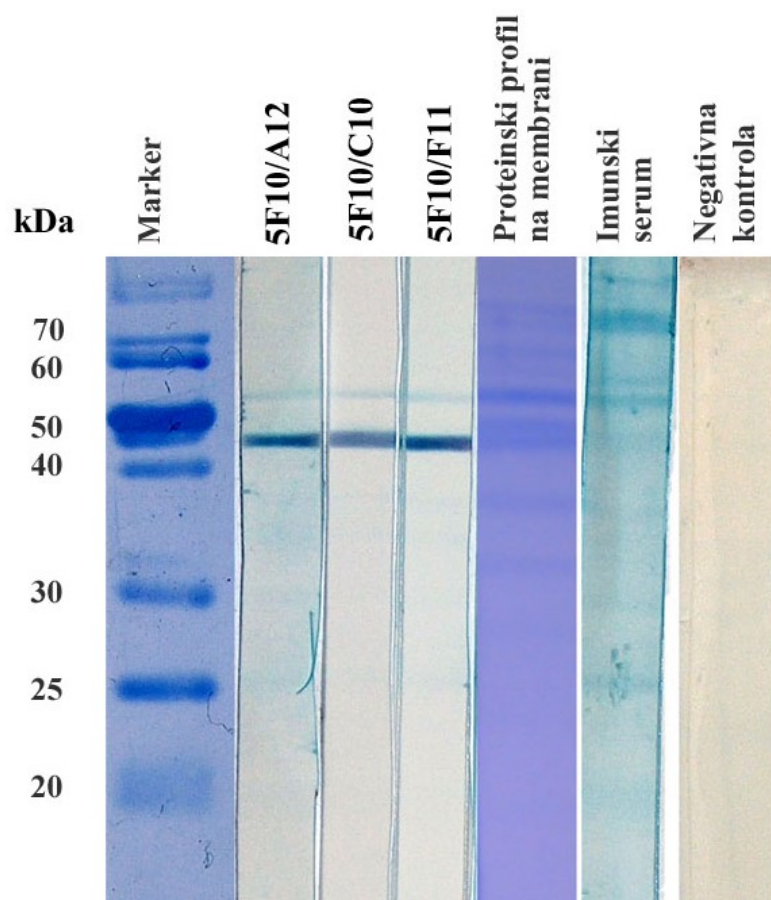
Na gelu je vidnih 15 proteinov bakterije *M. neurolyticum*. Po velikostnem redu od najmanjšega do največjega so 32, 33, 36, 46, 45, 50, 52, 58, 70, 75, 80, 85, 108, 123 in 145 kDa.

4.8 REZULTATI OPREDELITEV LASTNOSTI PROTEINA BAKTERIJE *M. neurolyticum*

S postopkom prenosa proteinov po Westernu smo ugotavljali, za katere proteine bakterije *M. neurolyticum* so pridobljena monoklonska protitelesa specifična. Z gelsko elektroforezo smo po velikosti ločili proteine, jih s prenosom po Westernu prenesli iz gela na membrano in izvedli test po protokolu DIBA.

Po barvanju membrane s Coomassie modro smo ugotovili, da se je iz gela na membrano preneslo 9 vidnih proteinov. Po velikostnem redu od najmanjšega do največjega so 33, 36, 45, 46, 50, 52, 58, 70 in 75 kDa.

Po obdelavi membrane z mišjim imunskim serumom smo ugotovili, da je prisotnih 9 imunogenih proteinov. Po velikostnem redu od najmanjšega do največjega so 25, 33, 36, 46, 52, 58, 70, 75 in 85 kDa.



Slika 5: Membrana PVDF z membranskimi proteini *M. neurolyticum*, po obdelavi z monoklonskimi protitelesi

Na membrani so se pojavile lise, in sicer na proteinu, kamor so se vezala monoklonska protitelesa. Iz slike je razvidno, da so se monoklonska protitelesa, ki jih sintetizirajo trije kloni, vsi potomci istega izvornega hibridoma, specifično vezala na isti protein z enako močno intenziteto. Protein ima velikost približno 46 kDa. Pojavila se je še ena šibka reakcija s proteinom velikosti približno 54 kDa.

Preglednica 12: Specifičnost monoklonskih protiteles

Oznaka klonov	Velikost proteina (kDa)	
	54	46
5F10/A12	+	+++
5F10/C10	+	+++
5F10/F11	+	+++
SFM	/	/
imun. serum	+	+

4.9 PREGLED PROTEINOV PO INTERNETNI BAZI

V dostopni literaturi smo med imunogenimi proteini mikoplazem našli kar nekaj takih, ki so v velikostnem razredu molekulske mase okoli 46 kDa. Močne antigene tega velikostnega razreda smo iskali pri mikoplazmah, ki so najbolj sorodne bakteriji *M. neurolyticum*, pri nekaterih mikoplazmah, ki okužujejo miši in podgane, kot tudi pri nekaterih drugih mikoplazmah. Podrobnejših podatkov ter značilnosti teh proteinov v literaturi nismo našli.

Močne antigene velikostnega razreda okoli 46 kDa imajo na svojih membranah naslednje mikoplazme: *M. hyorhinae*, *M. hyopneumoniae*, *M. conjunctivae*, *M. arthritis*, *M. pulmonis* in *M. hominis* (Preglednica 13, poglavje 2.2.2).

Preglednica 13: Imunogeni membranski proteini nekaterih mikoplazem velikostnega razreda od 42 do 48 kDa

Mol. masa prot.	<i>Mycoplasma hyorhinae</i>	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	<i>Mycoplasma conjunctivae</i>	<i>Mycoplasma arthritis</i>	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
42 kDa	+		+		+	
43 kDa		+		+		
45 kDa						+
46 kDa		+				
48 kDa		+				

Opomba: * - Membranska nukleaza MnuA

Lotili smo se tudi pregleda možnih proteinov tega velikostnega razreda po bazi podatkov v UniProtKB (UniProt, 2013). Pri *M. neurolyticum* smo našli samo podatke o proteinski sekvenci RNA polimeraze. Raziskovanje smo razširili na bakterije iz gruče *M. neurolyticum*. Ugotovili smo, da so le štiri bakterije, izmed trinajstih te gruče, ki so dobro preučene in imajo podatke o proteinih in domnevnih proteinih, pridobljenih iz podatkov sekvenciranih genomov. Pregledali smo membranske proteine šestih mikoplazem, in sicer *M. hyorhinae*, *M. hyopneumoniae*, *M. conjunctivae*, *M. flocculare*, *M. arthritis* in *M. pulmonis* (Preglednica 14).

Preglednica 14: Membranski proteini velikostnega razreda od 42 do 50 kDa, iz proteinske banke (UniProt, 2013)

Mol. masa prot.	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	<i>Mycoplasma conjunctivae</i>	<i>Mycoplasma flocculare</i>	<i>Mycoplasma arthritidis</i>	<i>Mycoplasma pulmonis</i>
42 kDa	P	P	Pdt		P, Dmp	P
43 kDa	P	P, Mn	P, Dmp	Mn		P, Dmp
44 kDa			Mn		P, P37	Mn
45 kDa		P, Dmp	Dmp		Dmp	
46 kDa	P37	Pp	P37	Pp, P37		
47 kDa					P*	P37
48 kDa	Dmp, P	P37			Dmp	
49 kDa	Dmp, Mn	P				
50 kDa	P, Mn, Ag	Dmp, P				

Opombe:

Dmp – Domnevni membranski protein

Mn – Membranska nukleaza (MnuA)

P37 – P37-podoben ABC transporter substrat-vezni lipoprotein

P – Permeaza, oligopeptid ABC transporter

Pdt – Prolipoprotein diacilgliceril transferaza

Pp – Površinski protein

Ag – Ag 243-5 protein

* – makrofag aktivirajoči protein

Pri teh mikoplazmah smo v tem velikostnem razredu našli sedem različnih tipov proteinov, in sicer permeaze, protein, ki v sistemu ABC transporta veže substrat (P37), transferazo, membransko nukleazo, nedefiniran površinski protein, domnevne membranske proteine, ter nedefiniran antigen Ag 245-5. Sicer smo pri teh mikoplazmah v proteinski bazi podatkov UniProtKB našli še mnogo neopisanih in domnevnih proteinov, katerih deli sekvenc, v primerjavi s sekvencami drugih bakterijskih vrst, nakazujejo na membranske proteine. Ker pa o njih ne vemo veliko, jih nismo zajeli v to raziskavo.

Če bi sklepali iz dokumenta o sekvenciranem genomu *M. hyopneumoniae* (Minion in sod., 2004), bi lahko rekli, da je povprečna velikost proteinov bakterije *M. neurolyticum* okoli 43 kDa (388 amino kislinskih ostankov). Iz tega lahko sklepamo, da bomo v tem velikostnem razredu našli veliko število različnih proteinov. Iz proteinske baze podatkov najbolj izstopata membranska nukleaza MnuA in P37-podoben ABC transporter substrat-vezajoči lipoprotein, ki sta oba imunogena.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Bakterije rodu *Mycoplasma* se, zaradi svoje evolucije, fiziologije in metabolizma, močno razlikujejo od običajnih bakterij. Imajo relativno kratek, vendar buren razvoj, saj so med reduktivno evolucijo izgubile velik del svojega genoma, to pa je med drugim privedlo do izgube celične stene in nekaterih metabolnih poti. Redukcija genoma se je pojavila kot posledica parazitskega načina življenja. Nekateri mikoplazmi so patogeni in predstavljajo zdravstveno in ekonomsko tveganje. Uvrščamo jih med najmanjše bakterije, ki so se še sposobne samostojno razmnoževati, taka fiziologija pa je za njihov razvoj ter obstoj gotovo prednost. Zaradi specifičnega metabolizma in specifičnih potreb po prekursorjih in hranilih so za gojenje zahtevne.

Mikoplazme povzročajo velike probleme v celičnih raziskovalnih laboratorijih. Kljub antibiotikom v mnogo primerih okužujejo celične kulture. Med kontaminanti najdemo tudi bakterijo *M. neurolyticum*. Za učinkovito odkrivanje okuženih celičnih kultur in identifikacijo povzročitelja so potrebne dobre diagnostične metode, predpogoj za to pa je dobro raziskan povzročitelj (Drexler in Uphoff, 2002).

Membranski proteini so vez med zunanostjo in notranostjo celice, v komunikacijskem in prehranjevalnem smislu. Lahko pa imajo vlogo pritrjevanja na gostiteljske celice in prispevajo k virulenci bakterije. Nekateri proteini imajo sposobnost imunomodulacije ter razvoja z okužbo povezanih vnetnih stanj. Ravno zaradi teh vlog so pomemben predmet raziskave in preučevanja. Eden od pristopov k preučevanju bakterij ter imunogenih membranskih proteinov je metoda opredeljevanja lastnosti le-teh z monoklonskimi protitelesi, kot je opisano v priložniku za vaje »Imunske tehnologije« (Narat, 2004).

Po štirih zaporednih imunizacijah miške BALB/C z membranskimi proteini bakterije *M. neurolyticum*, smo ji odvzeli vranico. Vzorec membranskih proteinov bakterije je pripravil Dr. Benčina. Suspenzijo vraničnih celic so tehnični sodelavci v laboratoriju po postopku zlili z mišjimi mielomskimi celicami NS0 in nato v selektivnem HAT gojišču pridobili hibridomske celice.

Pridobljene hibridomske celice smo gojili na petih mikrotitrskih ploščah s 96 luknjicami. Po sedmih dneh so mešanice različnih hibridomov že proizvedle toliko protiteles, da smo lahko izvedli test ELISA. Na podlagi rezultatov tega testa smo naredili selekcijo. Izmed vseh mešanic na mikrotitrski plošči smo jih izbrali deset, z visoko absorbanco (Preglednica

5), iz česar smo sklepali na proizvodnjo protiteles z visoko afiniteto do membranskih proteinov *M. neurolyticum*. To so bili 5F10, 4F5, 3G8, 3F1, 5G6, 3A2, 3G9, 3H11 in 5F7. Že rezultati prvega testa so nakazovali, da hibridomi 5F10 proizvajajo visok titer protiteles z visoko afiniteto. Poleg teh hibridomov so dali visoke absorbance še 4F5 in 3H4. Slabše rezultate so imeli trije hibridomi 3G8, 3F1 in 5G6, najslabše, a še vedno visoke, pa hibridomi 3A2, 3G9, 3H11 in 5F7. Teh deset hibridomov smo gojili 34 dni in vsi nadaljnji testi so nakazovali na stabilnost hibridomov 5F10. Na zadnjem testiranju ELISA je vrednost absorbance (0,411) hibridomov 5F10 dvakrat preseгла vrednost absorbance pozitivne kontrole (0,208), to je imunskega seruma. Pri 3H4 je bila vrednost absorbance (0,195) približno enaka imunskemu serumu, pri 4F5 pa je bila vrednost (0,094) le polovična. Rezultati ostalih hibridomov niso kazali tendence k povečevanju vrednosti rezultatov. Iz tega smo sklepali, da so ti hibridomi prenehali delovati. Vzrokov za to je lahko več, od stresa, previsoke koncentracije seruma v gojišču, redukcija tetraploidnih kromosomov in posledično izguba informacij za tvorbo protiteles (Frame in Hu, 1990).

Zaradi najvišje absorbance smo izbrali hibridome 5F10 za nadaljnje kloniranje. Sklepali smo, da proizvajajo protitelesa z visoko afiniteto do antigena. Z metodo redčitve do posameznih celic smo hibridome razporedili v 96 luknjic mikrotitrne plošče. Iz preglednice 6 je razvidno, da smo po desetih dneh dobili 19 praznih luknjic, 45 luknjic z več kot eno kolonijo in 32 luknjic z eno samo kolonijo oziroma s kloni. Med temi kloni so bili tudi taki, ki so slabo proizvajali protitelesa ali pa jih sploh niso. S ponovnim testiranjem ELISA smo izbrali tri klone z najvišjim titrom protiteles (preglednica 8), in sicer 5F10/A12, 5F10/C10 in 5F10/F11. Vrednosti absorbanc dveh klonov 5F10/A12 in 5F10/F11 sta bili nad vrednostjo imunskega seruma, vrednost absorbance klona 5F10/C10 pa pod vrednostjo imunskega seruma. Pridobili smo torej klone, ki so dajali visoke titre monoklonskih protiteles in so bili stabilni. Del teh klonov smo shranili na -70 °C.

Klone smo testirali na zmožnost rasti v rastnem mediju SFM, saj bi fetalni goveji serum lahko vplival na kasnejše rezultate. Na podlagi opazovanja, barvne spremembe gojišča SFM in prirasta celic smo ocenili, da vsi trije klone dobro rastejo v tem gojišču. Za pridobivanje protiteles smo klone gojili v SFM v velikih gojitvenih posodah, vzporedno pa še v gojišču DMEM z 10 % FBS in 0,1 % gentamicinom, v malih gojitvenih posodah, za primerjavo in zaradi varnosti, v primeru prenehanja rasti v SFM.

Po trimesečnem gojenju klonov smo dobili različne volumne gojišč z monoklonskimi protitelesi, ki smo jih med proizvodnjo hranili v hladilniku na 4 °C. Monoklonska protitelesa smo skoncentrirali in očistili. Najprej smo jih oborili z amonijevim sulfatom. Pri 50 % zasičenosti vzorcev so se protitelesa čez noč oborila. Z razsoljevanjem prek

membrane, ki prepušča zgolj 30 kDa velike delce, pa smo pridobili čista in skoncentrirana protitelesa. Resuspendirali smo jih v PBS. S testom DIBA smo preverili uspešnost obarjanja in določili relativno koncentracijo protiteles (preglednica 11). Protitelesa smo redčili v razmerju 1 : 100, antigene pa 1 : 50. Tu je prišlo do rahle pozitivne reakcije z negativno kontrolo PBS. Sklepamo, da je prišlo do nespecifične reakcije ali pa do eksperimentalne napake. Vsekakor pa so bile reakcije z monoklonskimi protitelesi močnejše od reakcije negativne kontrole in tako lahko rečemo, da so rezultati pozitivni. Zaradi redčitve koncentriranih protiteles v razmerju 1 : 100 je mogoče, da so bila bolj redčena od vzorcev pred obarjanjem in posledično so bili rezultati barvnih reakcij testa manj intenzivni od prejšnjih. Protitelesa klonov 5F10/A12 iz ravnega medija SFM so dala najboljši rezultat. Iz tega in prejšnjih podatkov smo sklepali, da so ti kloni najboljše proizvajali protitelesa in da imajo le-ta največjo afiniteto do antigena.

Proteine *M. neurolyticum* smo nanegli na 15 % akrilamidni gel in jih z elektroforezo SDS-PAGE ločili po velikosti. Po barvanju s Coomassie modro smo na gelu opazili 15 proteinov (slika 4) velikosti od 32 do 145 kDa. S prenosom po Westernu smo prenesli proteine iz gela na membrano PVDF. Po barvanju membrane smo ugotovili, da smo prenesli vsaj 9 proteinov, v razponu od 33 do 75 kDa.

Membrano smo obdelali z mišjim imunskim serumom in po nadaljnjem tretiranju, po protokolu testa ELISA, ugotovili, da imamo vsaj 9 imunogenih proteinov. Zanimivo je, da je pri obdelavi membrane z imunskim serumom lisa proteina velikosti 46 kDa komajda vidna. Verjetno je bila reakcija zelo šibka. Po obdelavi membrane s proizvedenimi monoklonskimi protitelesi treh klonov družine 5F10 pa smo pri vseh treh dobili močno obarvane lise na proteinu velikosti okoli 46 kDa (slika 5). Glede na to, da so vsi trije kloni iste družine in da protitelesa prepoznajo isti protein, lahko sklepamo, da prepoznajo tudi isti epitop. Pojavila se je še ena lisa velikosti okoli 54 kDa, ki je lahko posledica nespecifične reakcije ali posledica slabega razbarvanja.

Z monoklonskimi protitelesi 5F10 so dr. Benčine in sodelavci po zaključku našega eksperimenta izvedli še indirektni imunoperoksidazni test IIPA, po utečenem postopku (Benčina in sod., 1994). S tem testom smo ugotovili, da je epitop na površini celic intaktnih kolonij *M. neurolyticum*. S tem pa smo potrdili, da gre za membranski protein.

Po izvedbi metode prenosa proteinov po Westernu, monoklonska protitelesa 5F10 niso reagirala z membranskimi proteini *M. molare* (tipski sev). Test so izvedli dr. Benčina in sodelavci. Ta sev je izolat iz psa in ima močno NEAC. Bakterija *M. molare* spada v gručo

M. neurolyticum, torej sta si bakteriji filogenetsko zelo sorodni. Ta podatek nakazuje možnost, da ta protein velikosti 46 kDa izraža le bakterija *M. neurolyticum*.

Pri iskanju membranskega proteina bakterije *M. neurolyticum* velikosti 46 kDa smo si pomagali z literaturo ter z internetno bazo podatkov o proteinih UniProtKB (UniProt, 2013). V literaturi je zelo malo znanega o proteinih *M. neurolyticum*, zato smo se ozrli širše in našli nekaj imunogenih membranskih proteinov sorodnih bakterij iz gruč *M. neurolyticum* (poglavje 2.2.2). Iz internetne baze podatkov o proteinih pa smo videli, da je nekaj proteinov ohranjenih, kot so permeaze in membranske nukleaze, ki pa se med vrstami rahlo razlikujejo po velikosti. Poleg tega pa smo našli še mnogo neraziskanih in neopisanih proteinov ter domnevnih proteinov, ki so univerzalni za vsako vrsto posebej. Iz teh podatkov težko sklepamo na vrsto proteina bakterije *M. neurolyticum* velikosti 46 kDa.

5.2 SKLEPI

- Dobili smo tri klone iste družine, ki so stabilni in enako dobro proizvajajo monoklonska protitelesa proti istemu antigenu.
- Pridobljena monoklonska protitelesa imajo močno afiniteto do membranskega proteina velikosti 46 kDa.
- Protein bakterije *M. neurolyticum*, velikosti 46 kDa je imunogen in površinski protein.
- Vsaj devet proteinov bakterije *M. neurolyticum*, v velikostnem razredu od 25 do 85 kDa, je imunogenih za miš Balb/c.
- Za opis in opredelitev lastnosti proteina so potrebne še dodatne raziskave; obstaja verjetnost, da je ta protein membranska nukleaza (MnuA) ali pa lipoproteinu P37-podoben ABC transporter.

6 POVZETEK

Bakterijo *M. neurolyticum* so izolirali iz miši in podgan, za ti dve živalski vrsti pa je tudi patogena. Je mitogena za limfocite B. *M. neurolyticum* je edina izmed mikoplazem, ki proizvajajo zunajcelični nevrotoksin, ta pa povzroča progresivno bolezen »rolling disease«, ki se pri miših kaže kot nevrološke motnje, vrtenje miši okoli svoje daljše osi in pogin. Najnovejše raziskave pa kažejo na povezavo med tem toksinom in nevraminidazo. Bakterijo so izolirali tudi iz celičnih kultur eksperimentalnih laboratorijev. Okužbe predstavljajo grožnjo za obstoj celičnih kultur. Samo odkritje te mikoplazme sega v leto 1938, odkril pa jo je Sabin, med testiranjem vpliva toksoplazem na miši.

Namen diplomskega dela je bil odkriti in deloma preučiti vsaj enega bolj imunogenih membranskih proteinov bakterije *M. neurolyticum*. Uporabili smo hibridomsko tehnologijo. S suspenzijo bakterije *M. neurolyticum* smo miš Balb/c večkrat zapored imunizirali, s tem pa je bil vzburjen njen imunski odziv. Iz suspenzije vraničnih ter mielomskih celic so bili z zlivanjem celic proizvedeni hibridomi. Na podlagi rezultatov testa ELISA smo izbrali mešanico hibridomov z oznako 5F10, ki je proizvajala največ specifičnih protiteles. V postopku kloniranja smo te hibridome najprej osamili, s tehniko razredčevanja do posameznih celic. Dobili smo 32 različnih klonov, potomk ene same celice. Na podlagi testa ELISE smo izbrali tri klone, z najvišjimi absorbancami. To so bili kloni z oznakami 5F10/A12, 5F10/C10 in 5F10/F11. Z gojenjem teh klonov v rastnem mediju SFM smo pridobili večjo količino monoklonskih protiteles, ki smo jih nato oborili ter očistili v 50 % raztopini amonijevega sulfata. Po obarjanju smo se s filtriranjem prek membrane znebili soli amonijevega sulfata, monoklonska protitelesa pa smo resuspendirali v PBS. Tako smo dobili tri suspenzije monoklonskih protiteles treh različnih klonov iste družine, ki so bila pripravljena za uporabo. Da bi določili protein, proti kateremu smo pridobili protitelesa, smo membranske proteine najprej ločili na elektroforezi SDS-PAGE. Iz gela smo z metodo Western blot prenesli proteine na membrano PVDF, ki smo jo nato obdelali z monoklonskimi protitelesi. Postopek smo nadaljevali podobno kot pri testu DIBA in na proteinu velikosti 46 kDa dobili tri močno obarvane lise. Tako smo dobili podatek o velikosti imunogenega membranskega proteina bakterije *M. neurolyticum*. V literaturi smo iskali odkrite imunogene proteine, po internetni proteinski bazi podatkov pa proteine te velikosti, sorodnih mikoplazem in patogenih mikoplazem za miši in podgane. Med proteini smo našli dva možna kandidata, oba imunogena proteina, in sicer membransko nukleazo ter P37-podoben ABC transporter substrat-vezajoči lipoprotein.

7 VIRI

- Belloy L., Giacometti M., Abdoa E. M., Nicoleta J., Krawinklera M., Janovskyc M., Bruderer U., Freya J. 2001. Detection of specific *Mycoplasma conjunctivae* antibodies in the sera of sheep with infectious keratoconjunctivitis. *Veterinary Research*, 32, 2: 155-164
- Benčina D., Bradbury J. M., Stipkovits L., Varga Z., Razpet A., Bidovec A., Dovč P. 2006. Isolation of *Mycoplasma capricolum*-like strains from chickens. *Veterinary Microbiology*, 10, 112: 23-31
- Benčina D., Narat M., Bidovec A., Zorman-Rojs O. 2005. Transfer of maternal immunoglobulins and antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* to the allantoic and amniotic fluid of chicken embryos. *Avian Pathology*, 34, 6: 463-472
- Benčina D., Drobnič-Valič M., Horvat S., Narat M., Kleven S. H., Dovč P. 2001. Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. *FEMS Microbiology Letters*, 203, 1: 115-123
- Benčina D., Narat M., Dovč P., Drobnič-Valič M., Habe F., Kleven S. H. 1999. The characterization of *Mycoplasma synoviae* EF-Tu protein and proteins involved in hemadherence and their N-terminal amino acid sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 173, 85-94
- Benčina D., Kleven S. H., Elfaki M. G., Snoj A., Dovč P., Dorrer P., Russ I. 1994. Variable expressions of epitopes on the surface of *Mycoplasma gallisepticum* demonstrated with monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 23: 19-36
- Berčič R. L., Cizelj I., Benčina M., Narat M., Bradbury J. M., Dovč P., Benčina D. 2012. Demonstration of neuraminidase activity in *Mycoplasma neurolyticum* and of neuraminidase proteins in three canine *Mycoplasma* species. *Veterinary Microbiology*, 155, 2-4: 425-429
- Bricker T. M., Boyer M. J., Keith J., Watson-McKown R., Wise K. S. 1988. Association of lipids with integral membrane surface proteins of *Mycoplasma hyorhinis*. *Infection and Immunity*, 56, 2: 295-301

- Boyer M. J., Wise K. S. 1989. Lipid-modified surface protein antigens expressing size variation within the species *Mycoplasma hyorhinis*. *Infection and Immunity*, 57, 1: 245-254
- Chalker V. J., Brownlie J. 2004. Taxonomy of the canine Mollicutes by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2: 537-542
- Coenye T., Vandamme P. 2004. A genomic perspective on the relationship between the Aquificales and the epsilon-Proteobacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 3: 313-322
- Degiorgis M. P., Abdo E. M., Nicolet J., Frey J., Mayer D., Giacometti M. 2000. Immune responses to *Mycoplasma conjunctivae* in alpine ibex, alpine chamois, and domestic sheep in Switzerland. *Journal of Wildlife Disease*, 36, 2: 265-271
- Drexler H. G., Uphoff C. C. 2002. *Mycoplasma* contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, 39, 2: 75-90
- Droesse M., Tangen G., Gummelt I., Kirchhoff H., Washburn L. R., Rosengarten R. 1995. Major membrane proteins and lipoproteins as highly variable immunogenic surface components and strain-specific antigenic markers of *Mycoplasma arthritidis*. *Microbiology*, 141, 12: 3207-3219
- Dvorakova H., Valicek L., Reichelova M. 2005. Detection of *mycoplasma* contamination in cell cultures and bovine sera. *Veterinarni Medicina*, 50, 6: 262-268
- Edward D. G., Freundt E. A. 1956. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. *Journal of General Microbiology*, 14: 197-207
- Frame K. K., Hu W. S. 1990. The loss of antibody productivity in continuous culture of hybridoma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 5: 469-476
- Futo S., Seto Y., Okada M., Sato S., Suzuki T., Kawai K., Imada Y., Mori Y. 1995. Recombinant 46-kilodalton surface antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli* can be used for early specific diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 3: 680-683

- Galfre G., Milstein C. 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods in Enzymology*, 73, Pt B: 3-46
- Gleim D. 2013. List of prokaryotic names validly published. Braunschweig, Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH: 170 str.
http://www.dsmz.de/fileadmin/Bereiche/ChiefEditors/BacterialNomenclature/DSMZ_Bactnames.pdf (6. 2. 2014)
- Hottle G. A., Wright D. N. 1966. Growth and survival of *Mycoplasma neurolyticum* in liquid media. *Journal of Bacteriology*, 91, 5:1834-1839
- Johansson K. E., Pettersson B. 2002. Taxonomy of Mollicutes. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Razin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publisher: 1-29
- Katz R., Siman-Tov R., Naot Y. 1983. Comparison of mitogens from *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma neurolyticum*. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 56, 5-6: 613-21
- Kenny G. E. 1969. Serological comparison of ten glycolytic *Mycoplasma* species. *Journal of Bacteriology*, 98, 3: 1044-1055
- Kent U. M. 1994. Purification of antibodies using ammonium sulfate fractionation or gel filtration. V: Immunocytochemical methods and protocols. Javois L. C. (ed.). Totowa, Humana Press Inc.: 13-21
- Lapidot Z., Siman-Tov R., Naot Y. 1995. Monoclonal antibodies that inhibit mitogenic activity of *Mycoplasma pulmonis*. *Infection and Immunity*, 63, 1: 134-141
- Lavrič M., Benčina D., Kothlow S., Kaspers B., Narat M. 2007. *Mycoplasma synoviae* lipoprotein MSPB, the N-terminal part of VlhA haemagglutinin, induces secretion of nitric oxide, IL-6 and IL-1beta in chicken macrophages. *Veterinary Microbiology*, 121, 3-4: 278-287

- Lehmann D., Jouette S, Olivieri F, Laborde S., Rofel C, Simon E., Metz D., Felden L, Ribault S. 2009. Novel sample preparation method for molecular detection of Mollicutes in cell culture samples. *Journal of Microbiological Methods*, 80, 2: 183-189
- Ludwig W., Euzéby J., Whitman W. B. 2010. Road map of the phyla Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes V: Bergey's manual of systematics bacteriology. Vol. 4. 2nd ed. Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (eds.). New York, Springer: 1-19
- Maniloff J. 1992. Phylogeny of mycoplasmas. V: *Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis*. Maniloff J., McElhaney R.N., Finch, L.R., Baseman J.B. (eds.). Washington D.C., American Society for Microbiology: 549-559
- Maniloff J. 2002. Phylogeny and evolution. V: *Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas*. Razin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publisher: 31-43
- McAuliffe L., Ellis R. J., Lawes J. R., Ayling R. D., Nicholas R. A. 2005. 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 8: 731-739
- Minion F. C., Lefkowitz E. J., Madsen M. L., Cleary B. J., Swartzell S. M., Mahairas G. G. 2004. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *Journal of Bacteriology*, 186, 21: 7123-7133
- Mühlradt P. F., Kiess M., Meyer H., Sussmuth R., Jung G. 1997. Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *Journal of Experimental Medicine*, 185, 11: 1951-1958
- Naot Y., Tully J. G., Ginsburg H. 1977. Lymphocyte activation by various *Mycoplasma* strains and species. *Infection and Immunity*, 18, 2: 310-317
- Naot Y., Ginsburg H. 1978. Activation of B lymphocytes by mycoplasma mitogen(s). *Immunology*, 34, 4: 715-720

- Narat M. 2004. Priročnik za vaje pri predmetu imunske tehnologije. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 48 str.
- Nelson B. J., Lyons J. M. 1965. Phase-contrast and electron microscopy of murine strains of *Mycoplasma*. *Journal of Bacteriology*, 90, 6: 1750-1763
- Neyrolles O., Chambaud I., Ferris S., Prevost M. C., Sasaki T., Montagnier L., Blanchard A. 1999. Phase variations of the *Mycoplasma penetrans* main surface lipoprotein increase antigenic diversity. *Infection and Immunity*, 67, 4: 1569-1578
- Noormohammadi A. H., Markham P. F., Whithear K. G., Walker I. D., Gurevich V. A., Ley D. H., Browning G. F. 1997. *Mycoplasma synoviae* has two distinct phase-variable major membrane antigens, one of which is a putative hemagglutinin. *Infection and Immunity*, 65, 7: 2542-2547
- O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 10: 4007-4021
- Okamba F. R., Moreau E., Bouh C. S. K., Gagnon C. A., Massie B., Arella M. 2007. Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal portion of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14, 6: 767-774
- Ossewaarde J., de Vries A., Bestebroer T., Angulo A. 1996. Application of a *Mycoplasma* group-specific PCR for monitoring decontamination of *Mycoplasma*-infected *Chlamydia* sp. strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2: 328-331
- Peterson S. N., Fraser C. M. 2001. The complexity of simplicity. *Genome Biology*, 2, 2: 1-8
- Pitcher D. G., Nicholas R. A. 2005. *Mycoplasma* host specificity: fact or fiction? *Veterinary Journal*, 170, 3: 300-306
- Razin S. 2006. The genus *Mycoplasma* and related genera (class Mollicutes). V: Prokaryotes. Vol. 4. 3rd ed. Dworkin M., Falkow F., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer: 836-904

- Razin S., Yogev D., Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 62, 4: 1094-1156
- Razin S. 1978. The mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 42, 2: 414-470
- Robinson I., Freundt E. A. 1987. Proposal for an amended classification of anaerobic Mollicutes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37, 1: 78-81
- Rosengarten R., Behrens A., Stetefeld A., Heller M., Ahrens M., Sachse K., Yogev D., Kirchhoff H. 1994. Antigen heterogeneity among isolates of *Mycoplasma bovis* is generated by high-frequency variation of diverse membrane surface proteins. *Infection and Immunity*, 62, 11: 5066-5074
- Rottem S. 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiological Reviews*, 83: 417-432
- Sabin A. B. 1938a. Isolation of a filtrable, transmissible agent with "neurolytic" properties from *Toxoplasma*-infected tissues. *Science*, 88, 2278: 189-191
- Sabin A. B. 1938b. Identification of the filtrable, transmissible neurolytic agent isolated from *Toxoplasma*-infected tissue as a new Pleuropneumonia-like microbe. *Science*, 88, 2294: 575-576
- Sabin A. B. 1939a. Isolation of a filtrable, transmissible agent with "neurolytic" properties from *Toxoplasma*-infected tissues. *Science*, 89, 2306: 228-229
- Sabin A. B. 1939b. Mice as carriers of pathogenic Pleuropneumonia-like microorganisms. *Science*, 90, 2323: 18-19
- Sasaki T. 1991. Evidence that mycoplasmas, gram-negative bacteria, and certain gram-positive bacteria share a similar protein antigen. *Journal of Bacteriology*, 173, 7: 2398-2400
- Scarman A. L., Chin J. C., Eamens G. J., Delaney S. F., Djordjevic S. P. 1997. Identification of novel species-specific antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* by preparative SDS-PAGE ELISA profiling. *Microbiology*, 143, 2: 663-673

- Schnee C., Schulsse S., Hotzel H., Ayling R. D., Nicholas R. A. J., Schubert E., Heller M., Ehricht R., Sachse K. 2012. A novel rapid DNA microarray assay enables identification of 37 *Mycoplasma* species and highlights multiple *Mycoplasma* infections. *PloS One*, 7, 3: e33237, doi: 10.1371/journal.pone.0033237: 10 str.
- Shimizu T., Kida Y., Kuwano K., 2004. Lipid-associated membrane proteins of *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma penetrans* activate human immunodeficiency virus long-terminal repeats through Toll-like receptors. *Immunology*, 113, 1: 121–129
- Sirand-Pugnet P., Citti C., Barre´ A., Blanchard A. 2007. Evolution of Mollicutes : down a bumpy road with twists and turns. *Research in Microbiology*, 158, 10: 754-766
- Smith P. F. 1971. The biology of mycoplasmas. New York, Academic Press: 61-73
- Smith P. F. 1972. Lipid composition of *Mycoplasma neurolyticum*. *Journal of Bacteriology*, 112, 1: 554-558
- Spergser J., Rosengarten R. 2007. Identification and differentiation of canine *Mycoplasma* isolates by 16S–23S rDNA PCR-RFLP. *Veterinary Microbiology*, 125, 15: 170-174
- Störmer M., Vollmer T., Henrich B., Kleesiek K., Dreier J. 2009. Broad-range real-time PCR assay for the rapid identification of cell-line contaminants and clinically important mollicute species. *International Journal of Medical Microbiology*, 299, 4: 291-300
- Strasser M., Frey J., Bestetti G., Kobisch M., Nicolet J. 1991. Cloning and expression of a species-specific early immunogenic 36-kilodalton protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 59, 4: 1217-1222
- Sung H., Kang S. H., Bae Y. J., Hong J. T., Chung Y. B., Lee C. K. Song S. 2006. PCR-based detection of *Mycoplasma* species. *Journal of Microbiology*, 44, 1: 42-49
- Tang J., Hu M., Lee S., Roblin R. 2000. A polymerase chain reaction based method for detecting *Mycoplasma* and *Acholeplasma* contaminants in cell culture. *Journal of Microbiological Methods*, 39, 2: 121-126

Taylor J. K. J., Vandyk C., Minion F. C. 1999. Cloning of *mnuA*, a membrane nuclease gene of *Mycoplasma pulmonis*, and analysis of its expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181, 6: 1853-1860

The All-Species Living Tree Project. 2013. Bremen, The SILVA ribosomal RNA database project, Max Planck Institute for Marine Microbiology: 92 str.

http://www.arb-silva.de/fileadmin/silva_databases/living_tree/LTP_release_111/LTPs111_SSU_tree.pdf (19. 7. 2013)

Thomas L., Aleu F., Bitensky M. W., Davidson M., Gesner B. 1966a. Studies of PPLO infection. II. The neurotoxin of *Mycoplasma neurolyticum*. *Journal of Experimental Medicine*, 124, 6: 1067-1082

Thomas L., Bitensky M. W. 1966b. Studies of PPLO infection. IV. The neurotoxicity of intact mycoplasmas, and their production of toxin *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Medicine*, 124, 6: 1089-1098

Thompson C. C., Vieira M. N., Vicente P. A. C., Thompson F. L. 2011. Towards a genome based taxonomy of mycoplasmas. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 7: 1493-1824

Tully J. G. 1964. Production and biological characteristics of an extracellular neurotoxin from *Mycoplasma neurolyticum*. *Journal of Bacteriology*, 88, 2: 381-388

Tully J. G., Rose D. L., Hackett K. J., Whitcomb R. F., Carle P., Bove J. M., Colflesh D. E., Williamson D. L. 1989. *Mycoplasma ellychniae*, sp. nov., a sterol-requiring mollicute from the firefly beetle *Ellychnia corrusca*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39, 3: 284-289

UniProt: Universal Protein Resource. 2013. Genus *Mycoplasma*. Hinxton, Cambridge, European Bioinformatics Institute; Basel, SIB Swiss Institute of Bioinformatics; Washington, Protein Information Resource: baza podatkov

<http://www.uniprot.org/taxonomy/2093> (15. 8. 2013)

van Kuppeveld F. J., Melchers W. J., Willemsse H. F., Kissing J., Galama J. M., van der Logt J. T. 1992. Detection of *Mycoplasma pulmonis* in experimentally infected laboratory rats by 16S rRNA amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 3: 524-527

- Vasconcelos A. T., Ferreira H. B., Bizarro C. V., et al. 2005. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology*, 187, 16: 5568-5577
- Weisburg W. G., Tully J. G., Rose D. L., Petzel J. P., Oyaizu H., Yang D., Mandelco L., Sechrest J., Lawrence T. G., Van Etten J., Maniloff J., Woese C. R. 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: Basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, 171, 12: 6455-6467
- Woese C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51, 2: 221-271
- Woese C. R., Maniloff J., Zablen L.B. 1980. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 1: 494-498
- Woese C. R., Fox G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 11: 5088-5090
- Wright D. N. 1967. Nature of penicillin-induced growth Inhibition of *Mycoplasma neurolyticum*. *Journal of Bacteriology*, 93, 1: 185-190
- You X., Zeng Y., Wu Y. 2006. Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 7, 5: 342-350

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mojci Narat za izjemno podporo, strokovno pomoč in nasvete, ter pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se somentorici asistentki dr. Ireni Oven, za strokovno pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela.

Iskrena hvala tudi tehničnim sodelavcem in kolegom Ani Jakopič, dr. Ivanki Cizelj in Luku Bolhi, ki so mi v celičnem laboratoriju dajali podporo in nasvete.

Iskrena hvala tudi dr. Dušanu Benčini za strokovne nasvete o mikoplazmah in prof. dr. Tomu Turku za hiter in temeljit pregled diplomske naloge.

Hvala Miši Sovdat in Nataši Vlaović za lektoriranje in za hiter odziv, ter Lini Burkan za detajlen pregled in požrtvovalnost.

Hvala tudi moji partnerki Marjeti, staršema in prijateljem za potrpežljivost in spodbude.