

# Majhne, a mogočne: mikoplazme v boju za preživetje

Ivanka Cizelj, Saša Kastelic

V evoluciji je drobna bakterija mikoplazma, z okrnjenim genomom in brez celične stene, razvila mehanizme, ki ji omogočajo preživetje v zanjo neprijaznem okolju. Odsotnost celične stene jo brani pred penicilinskimi antibiotiki, mehka membrana ji omogoča, da se skriva pred obrambnimi molekulami v celico, z variabilnim izražanjem membranskih lipoproteinov se uspešno izogiba protitelesom gostitelja, če vse to ne zadostuje, vrne udarec, napade obrambne molekule z encimoma proteazo in sialidazo ter razgradi obrambne molekule in si pribori svoj obstoj v gostitelju.

## Kaj so mikoplazme?

Mikoplazme so najenostavnejši in najmanjši mikroorganizmi, ki so še sposobni samostojnega razmnoževanja. So edinstvena vrsta bakterij. Nimajo celične stene, obdaja jih le celična membrana, zato lahko zavzamejo različne oblike, od hruškaste, kokoidne in nitaste do verižne. Odkritje mikoplazem sega v leto 1898, ko sta Nocard in Roux izolirala prvo mikoplazmo – *Mycoplasma mycoides*, ki povzroča pljučno kugo pri govedu. Na začetku 20. stoletja so domnevali, da so mikoplazme virusi, saj lahko prehajajo skozi ultrafiltre, ki ostale bakterije zadržijo. Kasneje je bilo potrjeno, da so mikoplazme bakterije, ki so se razvile iz po Gramu pozitivne veje bakterij in v procesu degenerativne evolucije izgubile celično steno. Leta 2010 je Gibson s sodelavci umetno ustvaril celico mikoplazme, ki jo »upravlja« sintetični kromosom in je sposobna samostojnega razmnoževanja.

Mikoplazme uvrščamo v bakterijski razred Mollicutes (*mollis*, lat. mehak, upogljiv; *cutis*, lat. koža), ki je razdeljen v pet redov (Acholeplasmatales, Anaeroplasmatales,

Entomoplasmatales, Haloplasmatales in Mycoplasmatales). V rod *Mycoplasma* je trenutno uvrščenih 123 vrst.

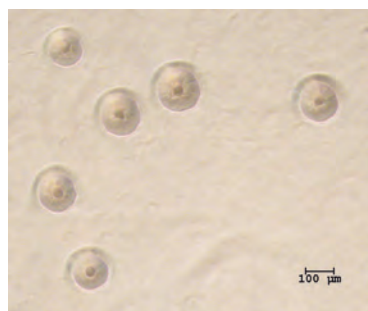
## Minimalna in najbolj preprosta celica

Predstavniki razreda Mollicutes ne morejo sintetizirati izhodne spojine muraminske kisline, ki je osnovni gradnik bakterijskih sten. Mikoplazme prodirajo in rastejo pod površjem trdnega gojišča, na površini pa imajo njihove do 2 milimetra velike kolonije oblike ocvrtega jajca s temnejšo vraščeno cono in svetlejšo obrobno cono.

Mikoplazme imajo razmeroma majhen krožni genom z dvoverižno DNA in nizko vsebnostjo gvanina in citozina (23 do 40 odstotkov). Genom je velik od 0,58 do 1,38 megabaze, kar ima za posledico drastično zmanjšanje biosintetskih sposobnosti in pojasnjuje odvisnost mikoplazem od gostitelja. Število genov, ki so vključeni v popravljalne mehanizme genetskega materiala z izrezovanjem in rekombinacijo, so mikoplazme zmanjšale na minimalno raven, ki še omogoča proces podvojevanja DNA in preživetje celice. Kljub minimalnemu genomu imajo mikoplazme številne krajše in daljše ponovitve nukleotidnih zaporedij, ki omogočajo različne tipe rekombinacij in preurejanje genoma. To na videz nepotrebno

Kolonije bakterij  
*Mycoplasma*  
*synoviae* na  
agarskem gelu  
pri 100-kratni  
povečavi.

Foto: Ivanka Cizelj.



zasedanje prostora v genomu se kaže predvsem v antigenski variabilnosti površinskih antigenov. Mikoplazme uporabljajo nadomestni genetski kod, kjer kodon UGA kodira aminokislino triptofan namesto običajnega stop kodona. Kapaciteta genoma je omejena na približno 700 različnih proteinov, kar je le dvakrat toliko, kot je teoretično izračunano število proteinov, potrebnih za delovanje hipotetične minimalne celice. Mikoplazme nimajo genov za sintezo aminokislin, nukleotidov, kofaktorjev, maščobnih kislin in sterolov. Njihov metabolizem je okrnjen. Nimajo Krebsovega cikla in ne kinonov ter citokromov, ki so pomembni za oksidativno fosforilacijo. Za pridobivanje energije in izhodnih spojin za makromolekule se najpogosteje poslužujejo fermentacije sladkorjev, hidrolize arginina ali oksidacije določenih organskih kislin (laktat, piruvat). Mikoplazme od gostitelja pridobijo vse, kar ne morejo sintetizirati same, ker so to sposobnost med evolucijo izgubile. Zaradi tega lahko mikoplazme gojimo v razmerah *in vitro* le na zelo bogatih gojiščih. Počasni napredek raziskav na tem področju je povezan z dejstvom, da za njihovo gojenje potrebujemo posebna gojišča in da jih težko vzgojimo iz kliničnih vzorcev. Da zaustavimo rast po Gramu pozitivnih bakterij, ki bi lahko prerastle mikoplazme, gojišču dodajamo penicilin. Proti njemu so namreč zaradi odsotnosti celične stene mikoplazme odporne.

### Mikoplazma, povzročiteljica obolenj

Zaradi svojih posebnosti so mikoplazme zajedavci ali komezali, ki so se uspešno prilagodili na življenje v različnih življenjskih prostorih, gostiteljih in tkivih. Zajedajo ljudi, vretenčarje in členonožce. Predstavniki rodu *Mycoplasma* naseljujejo površino sluznic dihalnih organov, urogenitalnega trakta, oči, prebavil, mlečne žleze in sklepov vretenčarjev. Za patogene vrste mikoplazem je značilno, da v večini primerov povzročajo kronične oblike bolezni z visoko stopnjo obolenosti in nizko umrljivostjo. Prena-

šajo se preko aerosola, hrane, vode, prahu, žuželk, z neposrednim stikom med gostitelji, z materinim mlekom na mladiče, pri pticah pa tudi preko valilnih jajc. Trditev, da so mikoplazme, ki okužujejo vretenčarje, izključno zunajcelični zajedavci, je bila ovržena leta 1989, ko je Lo odkril celice *Mycoplasma fermentans* v človeških celicah brez fagocitotzne aktivnosti. Hipoteza je bila še dodatno potrjena z odkritjem nove mikoplazemske vrste (*Mycoplasma penetrans*), ki lahko prehaja v različne tipe človeških celic. Nekatere vrste lahko na površinah tvorijo biofilm. Ta mehanizem jim omogoča, da se lažje zoperstavijo negativnim vplivom okolja. Mikoplazme ob okužbi povišajo izražanje genov, katerih produkti sodelujejo v poteh apoptoze, povzročijo povišano izločanje dušikovega oksida in citokinov, kar značilno poveča vnetni odziv gostitelja.

### Pritrditev na gostitelja in vdor v celico

Izrednega pomena za povzročitev okužbe, preživetje in kolonizacijo gostitelja je pritrditev mikoplazme na gostiteljsko celico. Uspešno kolonizacijo in pripenjanje na površino, kot je na primer sluznica dihal, omogočajo citadhezini, ki so na površini bakterije. Primarna interakcija med gostiteljem in mikoplazemsko celico poteka s površinskimi adhezini mikoplazem, ki so vsidrani v membrano kot lipoproteini. Določene mikoplazme imajo razvit poseben organel za pripenjanje na celice gostitelja. Ta edinstvena struktura je na končnem delu celice in uravnava tako adherenco (sprijetost) kot tudi gibanje mikoplazme. Vendar pa se gibajo in pripenjajo na gostitelja tudi mikoplazme, ki tega organa nimajo. Sposobnost gibanja pospeši in olajša prodor mikoplazemske celice skozi sloj mucina (sluzi) in vstavitve organov za pripenjanje med cilije. Mikoplazemske celice se pripnejo na membrano epitelnih celic v bazi cilij s proteini, ki so povezani z organelom za pripenjanje ali pa so difuzno razporejeni po celotni površini mikoplazemske celice. Odsotnost tr-

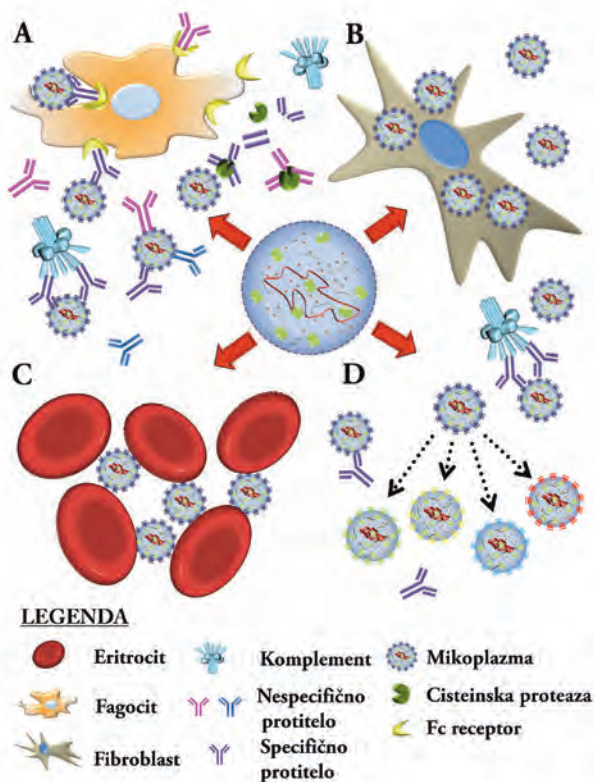
dne celične stene pri mikoplazmah omogoča neposredni stik med membranskimi proteini mikoplazem in gostiteljsko celico, kar lahko pripelje do zlitja z gostiteljsko celico ali vstopa mikoplazme v celico. Podaljšano znotrajcelično preživetje in/ali znotrajcelično razmnoževanje pripomoreta pri kolonizaciji in širjenju mikroba po gostitelju ter narekuje kronični potek bolezni. Invazivnost kokošje mikoplazme (*M. synoviae*) v celicah, ki nimajo fagocitozne aktivnosti, smo v razmerah *in vitro* dokazali pri kokošjih eritrocitih, kokošjih embrionalnih celicah in kokošjih hondrocitih. V vseh treh tipih celic je bilo mogoče najti celice *M. synoviae* prej kot 24 ur po okužbi. V celicah je *M. synoviae* ostala navzoča tudi dalj časa.

### Izmikanje imunskemu odgovoru gostitelja

Mikoplazme imajo mehanizem za nastanek antigenskih različic svojih površinskih antigenov, imenovan fazna variacija. Pri njej se hitro spreminja izražanje površinskih antigenov, ki vključuje spremembe aminokislinskega zaporedja in molekulske mase teh antigenov. Pri *M. gallisepticum* in *M. synoviae* so fazni variaciji podvrženi geni družine *vlhA*, ki so se med vrstama prenesli s horizontalnim prenosom. Organizacija in izražanje genov *vlhA* ter nastanek antigenskih različic se pri *M. gallisepticum* in *M. synoviae* raz-

likujejo. *M. gallisepticum* ima 30 do 70 različic gena *vlhA*, ki so organizirani v gruče, večina različic pa je translacijsko kompetentnih. *M. synoviae* pa ima številne psevdogene, ki pokrivajo različne ločene odseke gena *vlhA* in so organizirani v enotno gručo. Pri *M. gallisepticum* se naenkrat prepíše le en gen in na površini mikoplazemske celice se izrazi le ena različica lipoproteinskega hemaglutinina VlhA. Preklapljanje izražanja med različnimi člani genske družine je pospešeno s protitelesi proti izraženemu genu. Izražanje izmenjujočih se genov zagotovi, da imunski sistem ne prepozna antigenskih različic, kar olajša adhezijo mikroba na nove ciljne celice in omogoči kronični potek bolezni.

Čeprav je pri *M. synoviae* zgradba gena za VlhA očitno homologna posameznim genom *vlhA* pri *M. gallisepticum*, so antigen-



Poenostavljeni shematski prikaz procesov v organizmu gostitelja, ki se odvijajo po okužbi z mikoplazmo. A – imunski odgovor gostitelja na vdor mikroba in obramba mikoplazem pred protitelesi; B – vdor mikoplazem v celico, ki nima fagocitozne aktivnosti; C – hemaglutinacija (zlepljanje) eritrocitov z adhezini, ki se nahajajo na površini mikoplazemske celice; D – nastanek novih antigenskih različic površinskih antigenov, kot so na primer lipoproteini.

Avtorica slike: Ivanka Cizelj.

ske različice dosežene na drugačen način. *M. synoviae* ima le en popolni gen *vlhA*, v genomu pa so prisotne mnoge delne kopije z variabilno dolžino območja na genu *vlhA*, ki kodira karboksilni konec proteina. Te delne kopije se lahko rekombinirajo na dveh do petih specifičnih mestih na genu, ki se izrazi, in oblikujejo novo, neprepoznavno različico izraženega gena. Predvidevajo, da ta sistem omogoči več kot 500.000 različic. *M. synoviae* izraža variabilni lipoprotein, povezan s hemaglutinacijo, pri katerem pride do posttranslacijskega cepljenja na dva proteina, in sicer na 40 do 50 kDa velik N-konec oziroma MSPB in C-konec oziroma MSPA. MSPA deluje kot hemaglutinin, kar pomeni, da se veže na receptorje na eritrocitih in jih poveže v mrežo. Protitelesa proti MSPA, ki jih ustvari z mikoplazmo okuženi organizem, preprečijo nastanek hemaglutinacijske mreže. MSPB je najpomembnejši antigen. Protitelesa proti MSPB povzročijo, da *M. synoviae* začne izražati MSPB z drugačnimi epitopi.

### Odgovor gostitelja na napad

Tesni stik mikoplazme s površino gostiteljske celice lahko sproži kaskado signalov, ki potujejo do jedra celice in vplivajo na izražanje številnih genov v celici gostiteljici. Mikoplazme inducirajo (aktivirajo) številne citokine, ki uspešno vplivajo na številne biološke aktivnosti, kot sta na primer celična delitev in diferenciacija. Pri kolonizaciji tkiv in organov gostitelja mikoplazme povzročijo nastanek specifičnih protiteles, stimulirajo opsonizacijo in fagocitozo, aktivirajo komplement in limfocite T ali B. Toksični metaboliti mikoplazem, kot sta vodikov peroksid in superoksid, pa povzročijo oksidativne poškodbe celičnih membran gostitelja. Raziskave okužb kokoši z *M. gallisepticum* so pokazale, da je kopičenje limfocitov v zgodnji fazi okužbe posledica vpliva mikoplazemskih lipoproteinov na makrofage gostitelja. Ti se odzovejo s sproščanjem vnetnih kemokinov. V poznejši fazi, ko prevla-

dajo celice B, lahko antigenska variacija v lipoproteinih povzroči kronično stimulacijo limfatičnega tkiva. Mikoplazme interagirajo z imunskim sistemom gostitelja, vplivajo na aktivacijo makrofagov in indukcijo citokinov, njihove celične sestavine delujejo kot superantigeni, pogosto kot odziv na okužbo pride do nastanka avtoimunskih reakcij. S procesom antigenske variacije površinskih molekul so se sposobne izogibati imunskemu odzivu gostitelja.

### Napad na obrambne molekule gostitelja

Imunoglobulini G so eden glavnih izotipov protiteles. Najdemo jih v krvi in zunajcelični tekočini. Z vezavo in opsonizacijo patogenega mikroorganizma povečajo njegovo fagocitozo in ščitijo telo pred okužbo. Pri mikoplazmah so odkrili proteine, ki vežejo imunoglobuline G preko Fc dela. Vežanje mikoplazme s tem delom IgG lahko onemogoči njeno vezanje z receptorji Fc na celicah s fagocitotno aktivnostjo, kar preprečuje prepoznavo in uničenje mikoplazemske celice. Kot pomemben virulenčni dejavnik mikoplazem je bila opisana tudi sialidaza. Sialidaze kot virulenčni dejavniki sodelujejo pri pospeševanju mikrobne kolonizacije in invazije tkiva ter poškodbi sializiranih molekul, celičnih površin ali zunajceličnega matriksa gostitelja. Sialidaze delujejo kot razširitveni dejavnik, saj omogočajo nemoteno razmnoževanje bakterije in posledično invazijo gostiteljskega tkiva. Visoka koncentracija sialidaz inaktivira nekatere encime, hormone in serumske glikoproteine. V naših raziskavah smo dokazali, da sevi *M. synoviae*, ki izražajo visoko nevraminidazno aktivnost, iz glikoproteinov kokošjega seruma, trahealne sluzi in imunoglobulinov G odcepljajo strukture, vezane s sialidazno vezjo. Tretji napad na obrambne molekule pa določene vrste mikoplazem izvršijo s proteazami. Naša študija je pokazala, da *M. synoviae* in *M. gallisepticum* sintetizirata cisteinsko proteazo, ki razgradi gostiteljeve imunoglobuline G podobno kot papain na

variabilni in kostantni del. Napad na gostiteljeve imunoglobuline omogoča mikoplazmi daljše preživetje in obstoj v gostitelju. Bolezni, ki jih povzročajo mikoplazme, imajo prav zaradi omenjenih dejstev navadno kronični potek. Zdravljenje je dolgotrajno, uporabljajo pa makrolidne in tetraciklinske antibiotike. Pri ljudeh mikoplazme povzročajo obolenja kože, dihal, sečil in spolnih organov. V zadnjih letih intenzivno preučujejo vlogo mikoplazem pri nastanku rakastih tumorjev, saj znanstveniki pogosto izolirajo mikoplazmo iz tumoroznega tkiva.

#### Pomembnejši viri:

Browning, G. F., Marena, M. S., Markham, P. F., Noormohammadi, A. H., Whithear, K. G., 2010: *Mycoplasma*. V: Gyles, C. L., Prescott, J. F., Songer, G., Thoen, C. O., (uredniki): *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4. izd. Iowa: Wiley-Blackwell. 549-73.

Kleven, S. H., 2003: *Mycoplasma synoviae* infection. V: Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glisson, J. R., Fadly, A. M., McDougald, L. R., Swayne, D. E., (uredniki): *Diseases of poultry*. 11. izd. Iowa: State University Press. 756-66.

Noormohammadi, A. H., Markham, P. F., Duffy, M. F., Whithear, K. G., Browning, G. F., 1998: *Multigene families encoding the major hemagglutinins in phylogenetically distinct mycoplasmas*. *Infect Immun*, 66: 3470-3475.

Razin, S., Yogev, D., Naot, Y., 1998: *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 1094-1156.

Rottem, S., 2003: *Interaction of mycoplasma with host cells*.

*Physiological Reviews*, 83: 417-432.

Sirand-Pugnet, P., Lartigue, C., Marena, M., Jacob, D., Barré, A., Barbe, V., Schenowitz, C., s sod., 2007: *Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome*. *PLoS Genetics*, 3: 744-758.

*Slovarček manj znanih izrazov:*

**Antigen.** Snov, ki povzroči imunski odziv.

**Citadhezin.** Molekula, ki se nahaja na celični površini bakterije in omogoča njeno vezavo na celice. Vezava patogene bakterije na površino celic gostitelja je eden glavnih korakov v procesu kolonizacije gostitelja.

**Citokini.** Beljakovine z majhno molekulsko maso, ki delujejo kot posredniki med elementi imunskega sistema

**Epitop.** Imenujemo ga tudi antigenska determinanta in je območje v makromolekuli antigena, ki ga protitelesa specifično prepoznajo. Antigen ima lahko enega ali več epitopov.

**Hemaglutinacija.** Proces, v katerem posebne molekule, imenovane hemaglutinini, z vezavo na receptorje na eritrocitih povzročijo njihovo zlepljanje.

**Krebsov cikel.** Poznan tudi pod imenom cikel citronske kisline oziroma cikel trikarboksilnih kislin. Je del aerobne metabolne poti, ki je vključena v kemijske spremembe ogljikovih hidratov, maščob in beljakovin v ogljikov dioksid in vodo, nastane pa tudi energija. S Krebsovim ciklom si celica poleg energije zagotovi izhodne spojine za biosintezo aminokislin, porfirinov ter purinskih in pirimidinskih baz za nukleotide.

**Opsonizacija.** Proces, v katerem molekule imunskega sistema (na primer protiteles, molekule komplementa) prekrijejo površino tujka in s tem pospešijo proces fagocitoze.

**Sialidaza.** Encim, ki sodeluje v katabolizmu sialične kisline. Omogoča hidrolizo glikozidne vezi med sialično kislino in sladkorjem, na katerega je vezana. Pri mikoplazmah pa je tudi eden izmed glavnih virulencnih dejavnikov.



Ivanka Cizelj je diplomirala na Veterinarski fakulteti. Svoj študij je nadaljevala kot mlada raziskovalka na področju mikoplazmologije na Biotehniški fakulteti in leta 2011 doktorirala iz biokemije in molekularne biologije. Trenutno je zaposlena na Biotehniški fakulteti, kjer se med drugim posveča tudi študiju mehanizmov patogenega delovanja mikoplazem. Svojo ljubezen do narave povezuje s potovanji v daljnje dežele.



Saša Kastelic je leta 2011 diplomirala iz biotehnologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. V sklopu svojega podiplomskega študija preučuje mehanizme patogenega delovanja pasjih mikoplazem s poudarkom na raziskavah hemaglutininov in nevraminidaz. Prosti čas najraje preživlja v naravi ali pa ustvarja izdelke iz fimomase.