

**זיהוי גורמי אלימות בחיידקי מיקופלסמה בוביס מחוללי דלקות עטין  
בפרות חלב בישראל**

**דו"ח מסכם לתוכנית מחקר 847-0386-19**

*מוגש ע"י אינה ליסניאנסקי ונחום שפיגל*

31/12/20

תאריך משלוח הדו"ח

מס' המחקר	נושא המחקר
847-0386-19	זיהוי גורמי אלימות בחיידקי מיקופלסמה בוביס מחוללי דלקות עטין בפרות חלב בישראל

## שמות צוות החוקרים

מס' סדורי	שם החוקר/ת
חוקר ראשי	ליסנינסקי אינה
	נחום שפיגל

מוסד המחקר של החוקר הראשי: המכון הווטרינרי ע"ש קמרון, בית דגן

## סוג הדו"ח ותקופת המחקר:

שנתי	ביניים	מסכם	התחלת המחקר	סיום המחקר
		X	2017	2019

## מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח:

שם מקור המימון	קוד מקור המימון	הסכום שנתקבל עבור תקופת דיווח זה
מועצת החלב		80,000 ש"ח

## ת ק צ י ר (אין לחרוג מגבולות המסגרת)

החיידק מיקופלסמה בוביס הינו פתוגן ייחודי לבקר המחולל דלקות עטין בפרות חלב וגורם לנזק ביצור החלב ואיכותו ולפגיעה בבריאותן ורווחתן של החיות. מטרת המחקר הייתה לזהות את גורמי האלימות של החיידק ולאפינם במערכת *in vitro* ובמודל *in vivo* בעכברות מניקות. תוצאות עיקריות: נבנתה ספרייה גנומית של המוטנטים הרנדומליים ב-*m*. בוביס זן בר PG45 תוך שימוש בפלסמיד PMT85 המכיל טרנספוזון Tn4001 ואתרו מוטנטים ספציפיים בגנים המקודדים לאנזימי נוקלאז של החיידק (גן *mnuA* ( $\Delta 0215$ )) וגן 0310 ( $\Delta 0310$ )). כימות פעילות נוקלאז במוטנטים באמצעות RT-PCR וצבע picogreen הצביעה על החלשה של הפעילות במוטנט  $\Delta 0215$ , אך לא במוטנט  $\Delta 0310$ . אנזימי נוקלאז מפרקים ds-DNA שהוא מרכיב חשוב של ה-*neutrophil extracellular nets (NETs)* המופרשים על ידי נויטרופילים כתגובה לחשיפה לפתוגנים. התוצאות מראות היווצרות של ה-*NETs* בנויטרופילים שנחשפו ל- $\Delta 0215$  וזאת בהשוואה להעדר של ה-*NETs* בנויטרופילים שנחשפו לזן בר PG45. יכולת של MnuA לפרק את NETs מוכיחה שהנוקלאז הזה הינו גורם אלימות משוער של *m*. בוביס. בשלב הבא, שיערנו שירידה משמעותית בפעילות נוקלאז במוטנט בגן *mnuA*, תחליש את אלימות החיידק ותשפיע על יכולתו לגרום לדלקת עטין. לכן הוקענו תוך עטין עכברות מניקות עם  $\Delta 0215$  והשוונו בין דלקת עטין שנוצרה על ידי המוטנט לבין זאת הנגרמת על ידי זן בר. התוצאות מראות שלמרות ששני החיידקים עוררו מחלה בדרגת חומרה דומה, מספר החיידקים החיים שצמחו מבלוטה מוזרקה (back titration) עם המוטנט היה נמוך באופן משמעותי ( $P=0.0016$ ) מאשר מבלוטה שהוזרקה עם זן בר. יש להניח שפגיעה בגן המקודד ל-MnuA גרמה להחלשה של החיידק. זיהוי ואפיון של גורמי אלימות של החיידק *m*. בוביס יכולים להוביל להבנה עמוקה יותר של הפתוגנזה של המחלה ולפיתוח שיטות אבחון, מניעה וטיפול חדשניות אשר יתרמו להקטנת התחלואה ומזעור הנזקים הכלכליים הנובעים מהמחלה זו.

## 1. תקציר

החיידיק מיקופלסמה בוביס הינו פתוגן ייחודי לבקר המחולל דלקות עטין בפרות חלב וגורם לנזק ביצור החלב ואיכותו ולפגיעה בבריאותן ורווחתן של החיות. **מטרות המחקר הייתה** לזהות את גורמי האלימות של החיידיק ולאפינם במערכת *in vitro* ובמודל *in vivo* בעכברות מניקות. **תוצאות עיקריות:** נבנתה ספרייה גנומית של המוטנטים הרנדומליים ב-*m*. בוביס זן בר PG45 תוך שימוש בפלסמיד PMT85 המכיל טרנספוזון Tn4001 ואותרו מוטנטים ספציפיים בגנים המקודדים לאנזימי נוקלאז של החיידיק (גן *mnuA* ( $\Delta 0215$ ) וגן 0310 ( $\Delta 0310$ )). כימות פעילות נוקלאז במוטנטים באמצעות RT-PCR וצבע picogreen הצביעה על החלשה של הפעילות במוטנט  $\Delta 0215$ , אך לא במוטנט  $\Delta 0310$ . אנזימי נוקלאז מפרקים ds-DNA שהוא מרכיב חשוב של ה-*neutrophil extracellular nets* (NETs) המופרשים על ידי נוטרופילים כתגובה לחשיפה לפתוגנים. התוצאות מראות היווצרות של ה-NETs בנוטרופילים שנחשפו ל- $\Delta 0215$  וזאת בהשוואה להעדר של ה-NETs בנוטרופילים שנחשפו לזן בר PG45. יכולת של MnuA לפרק את NETs מוכיחה שהנוקלאז במוטנט בגן *mnuA*, תחליש את אלימות החיידיק הבא, שיערנו שירידה משמעותית בפעילות נוקלאז במוטנט בגן *mnuA*, תחליש את אלימות החיידיק ותשפיע על יכולתו לגרום לדלקת עטין. לכן הוקענו תוך עטין עכברות מניקות עם  $\Delta 0215$  והשוונו בין דלקת עטין שנוצרה על ידי המוטנט לבין זאת הנגרמת על ידי זן בר. התוצאות מראות שלמרות שני החיידיקים עוררו מחלה בדרגת חומרה דומה, מספר החיידיקים החיים שצמחו מבלוטה מוזרקה (back titration) עם המוטנט היה נמוך באופן משמעותי ( $P=0.0016$ ) מאשר מבלוטה שהוזרקה עם זן בר. יש להניח שפגיעה בגן המקודד ל-MnuA גרמה להחלשה של החיידיק. זיהוי ואפיון של גורמי אלימות של החיידיק *m*. בוביס יכולים להוביל להבנה עמוקה יותר של הפתוגנזה של המחלה ולפיתוח שיטות אבחון, מניעה וטיפול חדשניות אשר יתרמו להקטנת התחלואה ומזעור הנזקים הכלכליים הנובעים מהמחלה זו.

## 2. מבוא

דלקת עטין הינה אחת המחלות הנפוצות ברחבי העולם ובעלת משמעות כלכלית רבה לחקלאות. החיידיק מיקופלסמה בוביס נחשב לפתוגן ייחודי לבקר המחולל דלקות תת קליניות, קליניות או כרוניות בפרות לחלב ומכאן פגיעה ביצור החלב ואיכותו ובבריאותן ורווחתן של החיות (1). כיום אין חיסון יעיל כנגד החיידיק וגם טיפולים אנטיביוטיים לא תמיד מצליחים (2, 3). לפיכך, פיתוח כלים טיפוליים כמו גם אמצעי מניעה שימנעו את המחלה הינו אתגר מתמשך שדורש הבנה מעמיקה של מנגנוני הפתוגנזה וגורמי האלימות של *m*. בוביס (4).

למרות ש-*m*. בוביס הינו חיידיק זעיר וכביכול "פשוט" לא ידוע הרבה על גורמי האלימות של החיידיק ועל המנגנונים המאפשרים לו להתחמק ממערכת החיסון של המאכסן. עד כה, לא תוארו ב-*m*. בוביס גורמי אלימות ראשוניים, כגון רעלנים או *invasins*, אך נמצאו עדויות שחלק מהחלבונים השמורים (housekeeping proteins) יכולים לבצע מספר תפקידים (לדוגמה, לשמש כחלבוני הצמודות) כפי שהראו במקרה של elongation factor Tu and the E1  $\beta$  subunit of pyruvate של *dehydrogenase of Mycoplasma pneumoniae* (5). במהלך השנים האחרונות, זוהו ותוארו מספר גורמי אלימות של החיידיק (6) שהנחקרים ביניהם הם חלבוני שטח הפנים הוריאביליים ממשפחת Vsp-

(7), המעורבים בתהליכי היצמדות והתחמקות של החיידק ממערכת החיסון של המאכסן (8-12). לאחרונה, דווח על אקזונוקלאז MnuA (exonuclease) ונוקלאז MBOVPG0310 שמפרקים את extracellular traps neutrophil (NETs) - מבנים שנויטרופילים מפרישים כתגובה לחשיפה לפתוגנים שונים (13-15). בנוסף, חלבון MBOVPG0310 גרם לתגובה טוקסית במקרופאגים ול-apoptosis שלהם (15).

מחקרים על מגנוני האלימות והפתוגנזה של *M. m.* בוביס אינם רבים גם בגלל היעדר מודלים מתאימים וזולים, שלא מבוססים על חיות גדולות, וגם בגלל המחסור בשיטות יעילות למניפולציה גנטית של החיידק. אולם יש לציין, שפיתוח מתמשך של כלים גנומיים המתרחש לאחרונה, הוצעו גישות חדשניות לחקירת גורמי אלימות במיקופלסמות (16-18). כך לדוגמה, שימוש ב random transposon mutagenesis הוביל לזיהוי תפקידם של כמה גנים ב-*M. m.* בוביס, ובחן את השאלה מה היא הקבוצה המינימלית של הגנים הדרושה לקיום עצמאי של החיידק ועוד (15, 16, 19). למרות ההתקדמות בנושא, עדיין חסרים מחקרים העוסקים בזיהוי ואפיון של גורמי האלימות של *M. m.* בוביס. גילויי גורמי אלימות חדשים של *M. m.* בוביס עשויים להוביל להבנה עמוקה יותר של הפתוגנזה של המחלה ולפיתוח שיטות אבחון, מניעה וטיפול חדשניות אשר יתרמו להקטנת התחלואה ומזעור הנזקים הכלכליים הנובעים מהמחלה זו.

**3. מטרת המחקר הייתה** לזהות את גורמי האלימות של החיידק *M. m.* בוביס המבודד מדלקת עטין ולאפיינם במערכת *in vitro* ובמודל *in vivo* בעכברות מניקות.

## **4. תוצאות**

### **4.1 בניית ספריית המוטנטים של *M. m.* בוביס.**

הספרייה נבנתה ב-*M. m.* בוביס זן בר PG45 (בודד מדלקת עטין קלינית ב-1962 במדינת קונטיקט, ארצות הברית) תוך שימוש בפלסמיד PMT85 המכיל טרנספוזון Tn4001 (20) המקנה עמידות לאנטיביוטיקה ממשפחת האמינוגליקוזידים (עמידות לג'נטמיצין (Gn)). הכנסתו הרנדומלית של הטרנספוזון לגנום של *M. m.* בוביס בוצע באמצעות PEG8000 50% כפי שפורסם בעבר (20, 21). בסך הכול בוצעו 9 טרנספורמציות בזמנים שונים; יעילות הטרנספורמציות נעה בין 800-1300 cfu/ml. כ-1600 טרנספורמנטים נאספו וגודלו במצע נוזלי סלקטיבי עם Gn (כ-16 פלטות של 96 בארות). מכול פלטה נעשו מספר רפליקות אשר הוקפאו ב-80°C. צמיחה של כול מוטנט נבדקה על אגר סלקטיבי ונתונים הוכנסו לטבלת Excel. כ-10 מושבות רנדומליות נבדקו מכול הטרנספורמציות ב-PCR לזיהוי של *M. m.* בוביס ולבדיקת נוכחות של הגן המקודד לעמידות ל-Gn (התוצאות אינן מוצגות).

על מנת לאתר מוטנטים ספציפיים, ביצענו PCR על פול של DNA שהופק מפלטה של 96. השתמשנו בשני תחלים: אחד ספציפי לטרנספוזון ונמצא בשתי הקצוות שלו ושני ספציפי לגן המטרה. תוצרי ה-PCR נשלחו לריצוף (HU, ירושלים, ישראל) והריצף שהתקבל הושווה למאגר הרצפים הלאומי NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) באמצעות תוכנת BLAST. טבלה מס' 1 מסכמת את המוטנטים הספציפיים שזוהו עד כה. בסך הכול אותרו 21 מוטנטים ספציפיים הכוללים מוטנטים בגנים המקודדים

putative polysaccharide synthase ,ABC transporter systems ,nucleases/exonuclease -ל gene ואחרים. לגבי חלק מהגנים הללו קיימים דיווחים המקשרים בינם לבין פתוגניות של מיקופלסמות שונות (13, 22-25).

Mutant	Product	Mutant	Product
11-G5	MnuA <sup>1</sup> ; Exonuclease	3-F8	Recombinase
14-B6	MnuA <sup>1</sup> ; Exonuclease	1-B11	Peptidase C39 family/ABC transporter
11-H9	Nuclease <sup>2</sup>	11C5	Putative polysaccharide synthase gene (GsmA)
1-B9	Nuclease <sup>2</sup>	13A8	Trigger factor
15-F3	5'-Nucleotidase	6B11	GtsB-1; glycerol ABC transporter,
11-D11	Alternative sigma factor	10-B8	GtsC-1; glycerol ABC transporter, permease protein
7H5	OppA; putative oligopeptide ABC transporter	8D12	Putative membrane protein
1-D11	OppB; oligopeptide ABC transporter, permease protein	8-C3	Putative membrane protein
9F7	OppD; oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein	11-G10	Putative membrane protein
14-A10	Recombinase	9G9	Putative membrane protein
4-F11	Recombinase		

#### טבלה מס' 1: מוטנטים ספציפיים שאותרו.

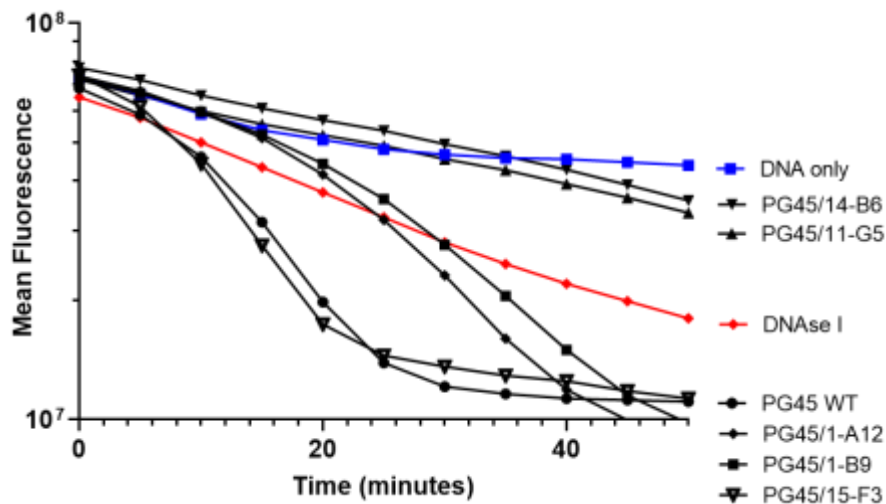
- <sup>1</sup> – שני מוטנטים בגן *mnuA*, אך מיקום כניסתו של ה-Tn לתוך הגן שונה ביניהם.  
<sup>2</sup> – שני מוטנטים בגן המקודד לנוקלאז, אך מיקום כניסתו של ה-Tn לתוך הגן שונה ביניהם.

בשלב הזה, התרכזנו בארבע מוטנטים: (א) שניים (11-G5, 14-B6) בגן *mnuA* ( $\Delta 0215$ ) שמקודד ל-exonuclease מרכזי של *M.* בוכיס ו(ב) שניים (11-H9 ו-1-B9) בגן המקודד לנוקלאז אחר ( $\Delta 0310$ ) של החיידק. ההבדל בין המוטנטים באותו הגן מתבטא במיקום הכניסה של הפלסמיד PMT85, אך בכול המקרים הכניסה התרחשה ב-2/3 הראשונים של הגנים. לא נצפו הבדלים בצמיחה *in vitro* של המוטנטים בהשוואה לזן בר. ה-MBOVPG45\_0310 מקודד לחלבון בעל 389 חומצות אמינו (ח. א) ומשקל מולקולרי משוער של 44.13 kDa ומהווה חלק מ-ABC transporter, שככול הנראה מעורב בהובלת הנוקלאוטידים. הגן *mnuA* מקודד לחלבון בעל 409 ח. א, בעל משקל מולקולרי משוער של 41.56 kDa והוא אינו מאורגן באופרון (14). שני החלבונים מכילים חלק הידרופובי בקצה ה-N שלהם כמו גם אתר החיתוך האופייני לחלבוני הליפופרוטאינים הבקטריאליים - כול זה מצביע על כך שמדובר בחלבוני שטח פנים של החיידק. בזמן ש-MnuA קשור לתת קבוצה של-Deoxyribonuclease 1 השייך

לקבוצת האנזימים exonuclease/endonuclease/phosphatase להם מנגנון חיתוך משותף, ה-  
 MBOVPG45\_0310 שייך ל- (14) micrococcal nuclease (thermonuclease).

#### 4.2 כימות פעילות נוקלאז במוטנטים.

על מנת לכמת את פעילות אקזו/נוקלאזות במוטנטים, הקמנו שיטה המבוססת על קרינה פלואורסצנטית וצבע picogreen הנקשר ל-dsDNA. בקצרה, הכנו ליזטים מארבע מוטנטים בנוקלאז, הוספנו לליזטים את  $\lambda$ -DNA ו-picogreen ובדקנו את רמת הפלואורסצנטיה התואמת לריכוז ה-dsDNA. קינטיקה של פעילות נוקלאזות הראתה ירידה בקרינה פלואורסצנטית של picogreen בליזט שהוכן מ-PG45 WT בהשוואה לרמת הפלואורסצנטיה של picogreen בליזטים שהוכנו משני המוטנטים ב-MnuA (איור 1). לא נצפתה ירידה בפעילות נוקלאז במוטנטים  $\Delta$ 0310 או מוטנט 15F3 המקודד ל-5'-nucleotidase (איור 1).

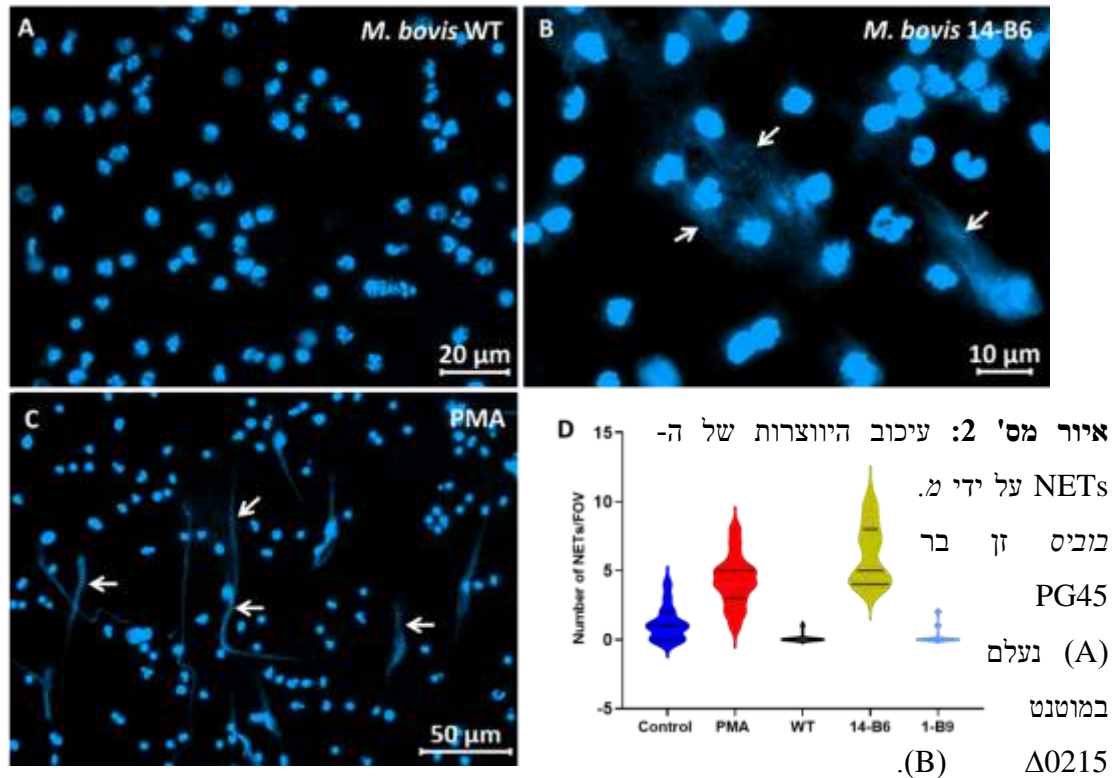


**איור מס' 1:** פעילות נוקלאזות הנמדדת באמצעות PCR בזמן אמת וצבע picogreen. פעילות נוקלאזות בזן בר PG45 ומוטנטים בגן *mnuA* (11-G5 ו-14-B6;  $\Delta$ 0215), בגן המקודד ל-5'-nucleotidase (1-B9, 1A-12;  $\Delta$ 0310), בגן המקודד ל-5'-nucleotidase (15F-3). ניתן לראות ירידה בפעילות נוקלאזית בשני המוטנטים בגן *mnuA*.

#### 4.3 השפעה של מ. בוביס זן בר PG45 והמוטנטים ב-MnuA על יצירת neutrophil extracellular nets (NETs) על ידי נויטרופילים.

הדבקה של בבלוטת החלב על ידי חיידקים גורמת, בדרך כלל, לגיוס מסיבי של נויטרופילים שמפרישים חומרים אנטיביוטיים שונים, ביניהם neutrophil extracellular nets (NETs). אחד המרכיבים החשובים של NETs הוא דנ"א, לכן שיערנו שלנוקלאז הממברנלי והמרכזי MnuA של החיידק מ. בוביס תפקיד חשוב ביציבות של ה-NETs. בנוסף, ההשערה הייתה שנראה הבדל משמעותי ביצירת ה-NETs בין זן בר PG45 ולבין המוטנטים ב-MnuA שהציגו פעילות נוקלאז נמוכה (איור מס')

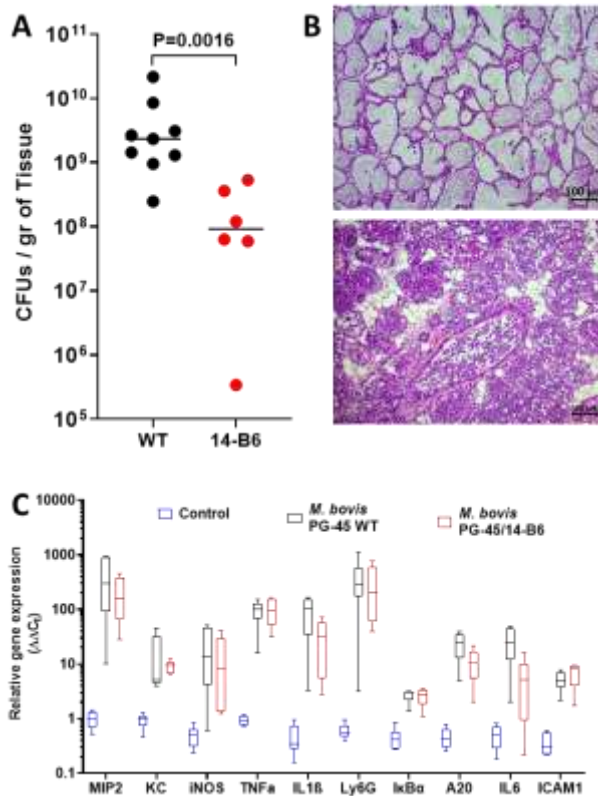
(1) כדי לבדוק את ההשערה, נויטרופילים שהופקו מדם של פרה, נחשפו לזן בר PG45 של *M. bovis* ולשני מוטנטים ב-*mnuA*. התוצאות מראות היווצרות של ה-NETs על ידי נויטרופילים שנחשפו למוטנטים אך לא בנויטרופילים שנחשפו ל-*M. bovis* זן בר (איור מס' 2).



נויטרופילים של בקר הודגרו במשך 4 שעות עם חיידקים ב- multiplicity of infection (MOI) 1000 או PMA (160 nM; C). גרעין ו-NETs נצבעו עם Hoechst. כימות יצירת ה-NETs בנויטרופילים נעשה באמצעות מיקרוסקופ פלואורסצנטי. החיצים מראים היווצרות של ה-NETs.

#### 4.4 בדיקת יכולת של המוטנט ב-*mnuA* ( $\Delta 0215$ ) לגרום לדלקת עטין בעכברות מניקות.

בשלב הבא, שיערנו שירידה משמעותית בפעילות נוקלאז במוטנט  $\Delta 0215$ , תחליש את אלימות החיידק ותשפיע על יכולתו לגרום לדלקת עטין. השתמשנו במודל של עכברות מניקות שהעמדנו לצורך זה והשוונו בין דלקת עטין שנוצרה על ידי זן בר PG45 לבין דלקת עטין שנוצרה עם המוטנט  $\Delta 0215$ . לצורך כך הזרקנו כ-  $10^9$  חיידקים חיים דרך הפטמה אל בלוטות החלב L4 ו-R4 של 3 עכברות מניקות מסוג BALB/c. רקמות הבלוטות עובדו לספירת החיידקים, צביעות ובדיקת הביטוי של ציטוקינים וכימוקינים בשיטת q-RT-PCR (איור מס' 3). התוצאות מראות שלמרות ששני החיידקים עוררו מחלה בדרגת חומרה דומה, מספר החיידקים החיים שצמחו מבלוטה מוזרקת (back titration) עם מוטנט  $\Delta 0215$  היה נמוך באופן משמעותי ( $P=0.0016$ ) מאשר מבלטה שהוזרקה עם זן בר (איור מס' 3).



**איור 3: הוקעה של בלוטות החלב של עכברות מניקות עם מ. בוביס זן בר PG45 ומוטנט ב-MnuA.** צמיחת החיידקים מבלוטות החלב המוזרקות (A): מ. בוביס זן בר PG45 (נקודות שחורות); כול נקודה מייצגת מספר חיידקים בבלטה אחת) ו- $\Delta 0215$ , מוטנט ב-MnuA (נקודות אדומות). דלקת עטין שהתפתחה הייתה דומה בשני המקרים (הוקעה עם זן בר ועם המוטנט) ואופיינה על ידי גיוס מסיבי של נויטרופילים לחללי החלב (B) ועליה בביטוי של מרקרים דלקתיים שנבדקו באמצעות QPCR (C). צביעת חתכי ה-FPPE עם H7E מבלוטה לפני (תמונה עליונה בפנל B) ואחרי ההוקעה (תמונה תחתונה בפנל B).

## 5. דיון ומסקנות

לאחרונה, מוטגנזה באמצעות טרנספוזונים נמצאה בשימוש נרחב לאיתור פקטורי אלימות במיקופלסמות שונות. במהלך המחקר הזה נבנתה ספריה גנומית של המוטנטים הרנדומליים בחיידק מ. בוביס זן בר PG45 ואותרו 21 מוטנטים ספציפיים (טבלה מס' 1) שנקשרו בעבר לאלימות של מיקופלסמות באופן כללי ושל מ. בוביס בפרט (22-25, 13). בשלב זה, התרכזנו בארבע מוטנטים: שנים בגן *mnuA* ( $\Delta 0215$ ) שמקודד ל-exonuclease מרכזי של מ. בוביס ושניים בגן המקודד לנוקלאז אחר ( $\Delta 0310$ ) של החיידק. לאנזימי נוקלאז תפקידים שונים וחשובים בחיידקים כגון פירוק של חומצות גרעין, השתתפות בתהליכי השכפול ורקומבינציה, כמו גם היצמדות לתאי המאכסן, פירוק של ה-NETs וביו-פילים וכו'. בהתחשב בעובדה שרוב המיקופלסמות אינן מסוגלות לסנתז מרכיבים של חומצות גרעין *de*



*novo*, פעילות נוקלאזות מאוד חיונית עבור החיידקים הללו ורוב המיקופלסמות מכילות יותר מנוקלאז אחד.

כימות פעילות נוקלאז במוטנטים הראתה הבדל בין מוטנטים בגן *mnuA* לבין מוטנטים בגן 0310, כאשר בראשון הפעילות ירדה באופן משמעותי בהשוואה לזן בר, ובשני לא (איור 1). תוצאה זו מצביעה על כך ש-MnuA הינו נוקלאז מרכזי של החיידק כפי שהראו שרמה ושותפיו (14). יכולת של MnuA לפרק את NETs המיוצרים *in vitro* על ידי נויטרופילים (איור 2) מוכיחה שהנוקלאז הזה הינו גורם אלימות משוער של מ. נוביס. התוצאות שלנו מאשרות את התוצאות של Mitiki et al. (13) אשר הראה גם הוא נוכחות של ה-NETs בנויטרופילים חשופים למוטנט ב-MnuA, אך היעדרות שלהם בנויטרופילים חשופים לזן בר PG45 או ל-complemented *mnuA* mutant. לנויטרופילים תפקיד חשוב בהגנת המאכסן מפני חיידקים ואחת האסטרטגיות שלהם היא יצירת ה-NETs. NETs הם מבנים דמוי רשת (web-like structures) של דנ"א חוץ תאי שיכולים ללכוד פתוגנים ולחשוף אותם לפפטידים אנטיביוטיים, רדיקלים, ופרוטאזות הנמצאים בנויטרופילים, תהליכים שבסופו של דבר גורמים להרג של הפתוגנים (26). יש לציין, שחלק מהפתוגנים פיתחו יכולות המאפשרות להם להתחמק מפעילות של NETs, ביניהם שימוש באנזימי נוקלאז. כך לדוגמא, נטרול של MnuA הומולוג Mpn491, ב-*Mycoplasma pneumoniae* גרם לעליה ברגישות של החיידק לפעילות הרג של ה-NETs (27). בדומה, שני מוטנטים בגנים המקודדים לנוקלאז של החיידק *Streptococcus equi* שרדו משמעותית טוב יותר בנוכחות ה-NETs מאשר זן בר (28). תוצאה דומה התגלתה גם בחיידק *Staphylococcus aureus* (29).

בעבודה שלנו, בדומה לתוצאות שהתקבלו במחקר של Sharma et al. (14), לא נצפתה ירידה בפעילות נוקלאזית במוטנט  $\Delta 0310$  (איור 1) כפי שהראו לגבי ההומולוג הרקומביננטי שלו הנמצא בחיידק *Mycoplasma hyopneumoniae* (30) וזאת יתכן מכיוון שבמוטנט  $\Delta 0310$  נמצא גן *mnuA* שלם. העובדה ש-MnuA הינו נוקלאז מרכזי יכולה גם להסביר את העדר מבני NETs בנויטרופילים שנחשפו למוטנט  $\Delta 0310$  (איור 2), תוצאה שהתקבלה גם במחקר של Mitiki et al. (13) כאשר, Zhang et al., דיווחו על כך שחלבון 0310 רקומביננטי גרם לפירוק של NETs בנויטרופילים (15).

ההוקעה של עכברות מניקות עם מוטנט  $\Delta 0215$  הראתה תמונה קלינית דומה לזאת המתקבלת עם זן בר PG45 (איור 3). יכול להיות שהזרקה של כמות גבוהה של החיידקים ( $10^9$  cfu) מסווה את הבדלים בתמונה קלינית בין זן בר לבין המוטנט. לכן, החלטנו להעמיד מודל בו נוקיע את העכברות עם  $10^6$  cfu חיידקים. בניסוי שבצענו עד כה עם זן בר PG45 הצלחנו לקבל דלקת עטין בעכברות מניקות באמצעות הזרקה של  $10^6$  cfu חיידקים (תוצאות לא מוצגות). בהמשך, נבצע הוקעה עם מוטנט  $\Delta 0215$  בריכוז  $10^6$  cfu חיידקים. למרות שלא התגלה הבדל בתמונה קלינית בין זן בר לבין המוטנט  $\Delta 0215$  ולא נראה הבדל בצמיחה של שני החיידקים הללו על מצע סליקטיבי, נצפה הבדל משמעותי ( $P=0.0016$ ) בכמות החיידקים שצמחו מבלוטות חלב מוזרקות (back titration) (איור 3). התוצאה הזאת הינה מעניינת ומבטיחה מאחר ומצביעה על כך שמוטנט ב-MnuA מוגבל ביכולתו ליצור חומצות גרעין *in vivo*. במהלך ההדבקה, לפתוגנים יכולת מוגבלת להשיג "אבני בנין" לסינתזת חומצות גרעין, לכן מוטציות שפוגעות במסלולים קטבוליים של פירוק דנ"א ורנ"א או במסלולים של ביוסינתזת של פורינים

או פירימידינים מחלישות את הפתוגנים כפי שהראו במקרה של *Yersinia pestis* (31). מיקופלסמות תלויות בפעילות של אנזימי נוקלאז שלהן מכיוון שהן אינן מסנתזות פורינים ופירימידינים *de novo*, לכן ניתן לחזות שפגיעה בפעילות של MnuA תהפוך את החיידק למוחלש.

## 6. רשימה של הפרסומים המדעיים

- כנס של האגודה הישראלית למיקרוביולוגיה (ISM). 2017. מכון וולקני. הרצאה.
- כנס של האגודה למדע הבקר. 2017. ירושלים. הרצאה.
- כנס של האגודה העולמית למיקופלסמה (IOM). 2018. פורטסמות, ניו-המפשייר, ארצות הברית. פוסטר.

## 7. רשימת ספרות

1. Nicholas RA, Fox LK, Lysnyansky I. 2016. Mycoplasma mastitis in cattle: To cull or not to cull. Vet J 216:142-147.
2. Gautier-Bouchardon AV. 2018. Antimicrobial resistance in *Mycoplasma* spp, p 425-446. In Schwarz S, Cavaco L, Shen J (ed), Antimicrobial resistance in bacteria from livestock and companion animals doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0030-2018. ASM Press, Washington, DC.
3. Nicholas RA. 2011. Bovine mycoplasmosis: silent and deadly. Vet Rec 168:459-462.
4. Calcutt MJ, Lysnyansky I, Sachse K, Fox LK, Nicholas RAJ, Ayling RD. 2018. Gap analysis of *Mycoplasma bovis* disease, diagnosis and control: An aid to identify future development requirements. Transbound Emerg Dis 65 Suppl 1:91-109.
5. Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB. 2002. Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. Mol Microbiol 46:1041-1051.
6. Bürki S, Frey J, Pilo P. 2015. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. Vet Microbiol 179:15-22.
7. Lysnyansky I, Sachse K, Rosenbusch R, Levisohn S, Yogev D. 1999. The *vsp* locus of *Mycoplasma bovis*: Gene organization and structural features. J Bacteriol 181:5734-5741.
8. Sachse K, Pftzner H, Heller M, Hanel I. 1993. Inhibition of *Mycoplasma bovis* cytoadherence by a monoclonal antibody and various carbohydrate substances. Veterinary Microbiology 36:307-316.
9. Sachse K, Grajetzki C, Rosengarten R, Hanel I, Heller M, Pftzner H. 1996. Mechanisms and factors involved in *Mycoplasma bovis* adhesion to host cells. Zentralbl Bakteriell 284:80-92.
10. Sachse K, Helbig JH, Lysnyansky I, Grajetzki C, W M, Jacobs E, Yogev D. 2000. Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. Infect Immun 68:680-687.
11. Thomas A, Sachse K, Farnir F, Dizier I, Mainil J, Linden A. 2003. Adherence of *Mycoplasma bovis* to bovine bronchial epithelial cells. Microb Pathog 34:141-148.
12. Buchenau I, Poumarat F, Grand DL, Linkner H, Rosengarten R, Hewicker-Trautwein M. 2010. Expression of *Mycoplasma bovis* variable surface membrane proteins in the respiratory tract of calves after experimental

- infection with a clonal variant of *Mycoplasma bovis* type strain PG45. Res Vet Sci 89:223-229.
- .13 Mitiku F, Hartley CA, Sansom FM, Coombe JE, Mansell PD, Beggs DS, Browning GF. 2018. The major membrane nuclease MnuA degrades neutrophil extracellular traps induced by *Mycoplasma bovis*. Vet Microbiol 218:13-19.
  - .14 Sharma S, Tivendale KA, Markham PF, Browning GF. 2015. Disruption of the membrane nuclease gene (MBOVPG45\_0215) of *Mycoplasma bovis* greatly reduces cellular nuclease activity. J Bacteriol Online.
  - .15 Zhang H, Zhao G, Guo Y, Menghwar H, Chen Y, Chen H, Guo A. 2016. *Mycoplasma bovis* MBOV\_RS02825 encodes a secretory nuclease associated with cytotoxicity Int J Mol Sci 17:628.
  - .16 Sharma S, Markham PF, Browning GF. 2014. Genes found essential in other mycoplasmas are dispensable in *Mycoplasma bovis*. PLoS ONE 9:e97100.
  - .17 Chopra-Dewasthaly R, Marenda M, Rosengarten R, Jechlinger W, Citti C. 2005. Construction of the first shuttle vectors for gene cloning and homologous recombination in *Mycoplasma agalactiae*. FEMS Microbiol Lett 253:89-94.
  - .18 Bonnefois T, Vernerey MS, Rodrigues V, Totte P, Puech C, Ripoll C, Thiaucourt F, Manso-Silvan L. 2016. Development of fluorescence expression tools to study host-mycoplasma interactions and validation in two distant mycoplasma clades. J Biotechnol 236:35-44.
  - .19 Rasheed MA, Qi J, Zhu X, Chenfei H, Menghwar H, Khan FA, Zhao G, Zubair M, Hu C, Chen Y, Chen H, Guo A. 2017. Comparative genomics of *Mycoplasma bovis* strains Reveals that decreased virulence with increasing passages might correlate with potential virulence-related factors. Front Cell Infect Microbiol 7:177.
  - .20 Chopra-Dewasthaly R, Zimmermann M, Rosengarten R, Citti C. 2005. First steps towards the genetic manipulation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* using the transposon Tn4001mod. Int J Med Microbiol 294:447-453.
  - .21 Baranowski E, Guiral S, Sagne E, Skapski A, Citti C. 2010. *Mycoplasma agalactiae* interaction with mammalian cells: the critical role of dispensable genes. Infect Immun 78:1542-1551.
  - .22 Hopfe M, Dahlmanns T, Henrich B. 2011. In *Mycoplasma hominis* the OppA-mediated cytoadhesion depends on its ATPase activity. BMC Microbiol 11:185.
  - .23 Zhu X, Dong Y, Baranowski E, Li X, Zhao G, Hao Z, Zhang H, Chen Y, Hu C, Chen H, Citti C, Guo A. 2020. Mbov\_0503 encodes a novel cytoadhesin that facilitates *Mycoplasma bovis* interaction with tight junctions. Microorganisms 8:164.
  - .24 Tseng CW, Chiu CJ, Kanci A, Citti C, Rosengarten R, Browning GF, Markham PF. 2017. The *oppD* gene and putative peptidase genes may be required for virulence in *Mycoplasma gallisepticum*. Infect Immun 85.
  - .25 Gaurivaud P, Baranowski E, Pau-Roblot C, Sagne E, Citti C, Tardy F. 2016. *Mycoplasma agalactiae* secretion of beta-(1->6)-glucan, a rare polysaccharide in prokaryotes, is governed by high-frequency phase variation. Appl Environ Microbiol 82:3370-3383.
  - .26 Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 303:1532-1535.

- .27 Yamamoto T, Kida Y, Sakamoto Y, Kuwano K. 2017. Mpn491, a secreted nuclease of *Mycoplasma pneumoniae*, plays a critical role in evading killing by neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol* 19.
- .28 Ma F, Guo X, Fan H. 2017. Extracellular nucleases of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* degrade neutrophil extracellular traps and impair macrophage activity of the host. *Appl Environ Microbiol* 83.
- .29 Berends ET, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, von Kockritz-Blickwede M. 2010. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun* 2:576-586.
- .30 Schmidt JA, Browning GF, Markham PF. 2007. *Mycoplasma hyopneumoniae* *mhp379* is a Ca<sup>2+</sup>-dependent, sugar-nonspecific exonuclease exposed on the cell surface. *J Bacteriol* 189:3414-3424.
- .31 Brubaker RR. 1972. The genus *Yersinia*: biochemistry and genetics of virulence. *Curr Top Microbiol Immunol* 57:111-158.