

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Ivana Morić

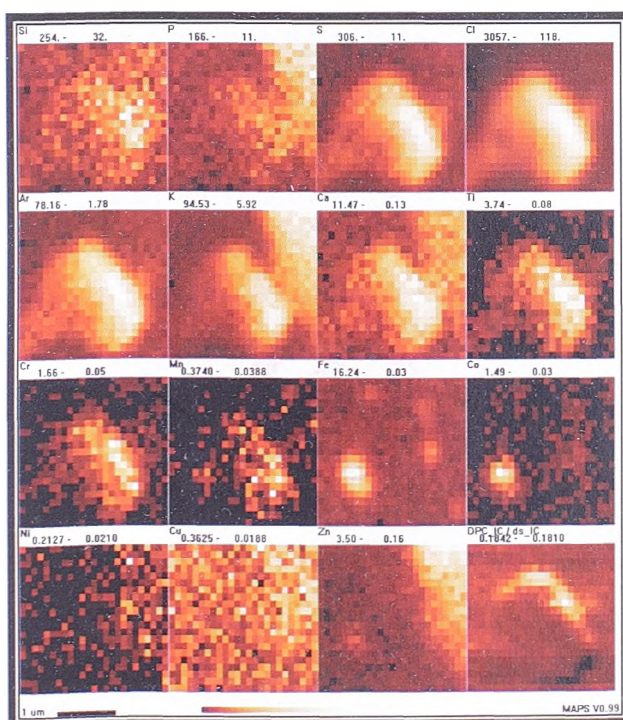
**Primena mikroskopije X zracima u
mapiranju hemijskih elemenata u
Mycobacterium avium pks 12
mutantu**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2006.

UNIVERZITET U BEOGRADU
Biološki fakultet

Primena mikroskopije X zracima u
mapiranju hemijskih elemenata u
Mycobacterium avium pks12 mutantu



Ivana Morić

Doktorska disertacija

Beograd, 2006.

MENTOR: dr Branka Vasiljević, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku
i genetičko inženjerstvo, Beograd

MENTOR: dr Jelena Knežević-Vukčević, vanredni profesor,
Biološki fakultet, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE: dr Jelena Knežević-Vukčević, vanredni profesor,
Biološki fakultet, Beograd

dr Branka Vasiljević, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku
i genetičko inženjerstvo, Beograd

dr Nataša Golić, viši naučni saradnik,
Institut za molekularnu genetiku
i genetičko inženjerstvo, Beograd

DATUM ODBRANE: _____

DATUM PROMOCIJE: _____

DOKTORAT NAUKA: _____

Mojoj porodici

Ovaj rad je realizovan u Sektoru 2 Advance Photon Source u Argonne National Laboratory, Argonne, u Illinoisu, Sjedinjene Američke Države. Ovom prilikom želim da se zahvalim:

dr Tanji Paunesku i mr Nataši Stojićević, dragoj prijateljici, saradnici i cimerki, koje su mi omogućile da se susretnem sa neverovatnim mogućnostima koje pružaju sinhrotronske tehnike;

dr Joerg-u Maser-u, dr Dirk-u Wagner-u i profesoru Luiz-u Bermudez-u za nesebičnu podršku i poverenje koje su mi ukazali ne samo u poslovnoj saradnji, bez kojih moj rad u SAD ne bi bio moguć;

prof. dr Jeleni Knežević-Vukčević na kritičkoj oceni ove teze;

dr Branki Vasiljević na svom strpljenju koje je imala za mene i na pomoći oko pisanja teze;

dr Nataši Golić, dragoj kolegici na svim sugestijama u toku pisanja teze;

dr Milanu Kojiću, čija mi je preporuka, po priznanju dr Joerg-a Maser-a i dala šansu da se oprobam u interdisciplinarnom pristupu biologiji;

mr Nadi Stanković, laboratorijskom sadrugu, na svim lektorskim korekcijama.

Želim da se zahvalim članovima moje nove laboratorije, Laboratorija za molekularnu genetiku aktinomiceta, IMGGI, koji su me prihvatili od samog početka kao svog člana. I naravno, lab06. ☺ Hvala i svim drugim članovima IMGGI.

Posebno se zahvaljujem mojim najbližima na podršci i pažnji kojom su me okruživali u toku pisanja teze.

APSTRAKT

Mycobacterium avium je važan humani intracelularni patogen, koji prvenstveno inficira mononuklearne fagocite. Sredinski uslovi unutar fagozoma u kojima se može naći ova mikobakterija, kao što je koncentracija elemenata u tragovima, utiče na ekspresiju mikobakterijskih gena i intracelularno preživljavanje. Koristeći mikroprobu sa tvrdim X zracima u prethodnom radu su analizirane koncentracije hemijskih elemenata unutar fagozoma C57BL/6 mišijih makrofaga koji su inficirani patogenim mikobakterijskim vrstama – *M. tuberculosis* i *M. avium*, odnosno nepatogenom vrstom, *M. smegmatis*. U fagozomima koji su sadržali patogene mikobakterije, koncentracija gvožđa je rasla tokom vremena, dok je u onim sa nepatogenom *M. smegmatis* koncentracija gvožđa opadala. Značajna razlika u koncentraciji nekoliko drugih elemenata u fagozomima je zabeležena između patogenih mikobakterija u prvom satu infekcije, kao i između patogenih mikobakterija i *M. smegmatis*. Ovi rezultati ukazuju na postojanje patogen-specifične mikrosredine u endozomalnom sistemu domaćina. U ovom radu istraživanja su proširena na infekcije U937 ćelijske linije, modela humane mikobakterijemije, sa *M. avium* wt i *M. avium pks12* mutantom. Gen *pks12* gene je kandidat za gen za virulentnost. Njegov produkt je uključen u sintezu komponente ćelijskog zida. Koncentracija gvožđa u U937 fagozomima nije porasla posle 24 h infekcije, kao što je zabeleženo u C57BL/6 fagozomima. Sa druge strane, u U937 fagozomima koji su sadržali *M. avium pks12* mutant koncentracija gvožđa je statistički značajno opala posle 24 h infekcije. Statistički značajan porast koncentracije kalijuma između prvog i 24. sata infekcije je zabeležen u U937 fagozomima koji su sadržali *M. avium* wt, za razliku od C57BL/6 fagozoma. Slično povećanje koncentracije kalijuma u toku infekcije je zabeleženo u U937 fagozomima sa *M. avium pks12* mutantom. Razmatrana je mogućnost da su kalijumski kanali prisutni na fagozomima makrofaga i da mogu biti povezani sa baktericidnim dejstvom, slično neophodnom prisustvu kalijumskih kanala za baktericidnu funkciju neutrofila. Takođe je traženo postojanje razlika između C57BL/6 i U937 fagozoma, kao i između U937 fagozoma koji su sadržali *M. avium* wt, odnosno *M. avium pks12* mutant, koje bi mogle ukazati na ulogu produkta *pks12* gena u virulenciji. Ovaj rad ukazuje na značaj korišćenja mikroprobe sa tvrdim X zracima u proučavanju patogenih mikobakterijskih infekcija i podržava procenu da bi buduće studije sa tehnički poboljšanom mikroprobom sa tvrdim X zracima omogućile bolje razumevanje virulentnosti infektivnih patogena.

Ključne reči: mikobakterija, fagozomi, elementi u tragovima

ABSTRACT

Mycobacterium avium is important human intracellular pathogen that infects primarily mononuclear phagocytes. The environment of the mycobacteria inside the phagosome, such as the concentration of trace elements, is likely to influence mycobacterial gene expression and intracellular survival. In previous work, using hard X-ray microprobe, it has been analyzed the elemental concentrations inside the phagosomes of C57BL/6 mouse macrophages infected with pathogenic mycobacterial species – *M. tuberculosis* and *M. avium*, or the apathogenic *M. smegmatis*. In phagosomes infected with pathogenic mycobacteria, the iron concentration increased over the time, while in those of avirulent *M. smegmatis*, the iron decreased. Significant difference in the phagosomal concentration of several other elements was observed between pathogenic mycobacteria after the first hour of infection, as well as some elements showed different phagosomal concentrations between pathogenic mycobacteria and *M. smegmatis*. The results indicate pathogen-specific microenvironments within the host cell's endosomal system. In this work studies were expanded to *M. avium* wt- and *M. avium pks12* mutant- infections of U937 cell line, a model for human bacteremia. The *pks12* gene is a candidate for virulence gene. Its product is involved in synthesis of cell wall component. The iron concentration in U937 phagosomes didn't increase after 24 hours of infection with *M. avium* wt, as was in C57BL/6 phagosomes. On the other hand, U937 phagosomes-containing *M. avium pks12* mutant showed a significant decrease of iron concentration after 24 hours of infection. A significant increase of potassium concentration was observed in U937 phagosomes-containing *M. avium* wt between 1 and 24 hours, in contrast with macrophages from C57BL/6 mice. Similar increase of potassium during a course of infection was observed in U937 phagosomes-containing *M. avium pks12* mutant. It was hypothesized that a potassium channel is abundant in the phagosome in macrophage that may be related to microbiocidal killing, similar to the requirement of potassium channels for microbiocidal function in neutrophils. It was also sought to determine whether there were differences between C57BL/6 and U937 phagosomes, as well as between U937 phagosomes containing either *M. avium* wt or *M. avium pks12* mutant, which could indicate the role in virulence of *pks12* gene product. These studies show the importance of the use of a hard X-ray microprobe for the study of pathogenic bacterial infections, and support the assessment that future studies with technically improved hard X-ray microprobe will allow a better understanding of the virulence of infectious pathogen.

Key words: mycobacteria, phagosomes, trace elements

Sadržaj

I Uvod	1
1. <i>Mycobacterium species</i>	1
1.1. Klasifikacija i karakteristike roda <i>Mycobacterium</i>	1
1.2. Značaj vrsta <i>Mycobacterium</i>	2
1.2.1. <i>Mycobacterium avium</i>	3
1.3. Ulazak i preživljavanje u ćelijama domaćina	5
1.4. Ćelijski zid vrste <i>Mycobacterium</i> - karakteristike i uloga	9
1.4.1. Poliketid sintaza 12 (<i>pkc12</i>)	11
1.5. “Signature tagged” mutageneza	13
2. Sinhrotron i primena sinhrotronske radijacije	16
2.1. Prednosti sinhrotronske svetlosti	16
2.2. Sinhrotronske komponente	17
2.3. Primena sinhrotronske svetlosti	18
2.3.1. Primena u biologiji	19
2.4. Mikroskopija X zracima	20
2.4.1. Fizičke osnove X zracima indukovane fluorescencije X zraka	22
2.4.2. Mikroproba sa tvrdim X zracima – Mikroskop sa X zracima	24
2.4.2.1. Primena mikroprobe sa tvrdim X zracima u	

biomedicinskim istraživanjima	27
II Cilj rada	30
III Materijal i metode	31
3.1. Bakterijski sojevi	31
3.2. Čelijska linija	31
3.3. Uslovi gajenja	31
3.3.1. Kultura mikobakterija	31
3.3.2. Kultura U937 ćelija	32
3.4. Priprema uzoraka	32
3.4.1. Zasejavanje U937 ćelija na mrežice („finder grid“)	32
3.4.2. Određivanje gustine bakterija McFarland-ovim standardom	33
3.4.3. Infekcija U937 ćelija	34
3.5. Optička mikroskopija	35
3.6. Mikroskopija tvrdim X zracima	36
3.7. Analiza rezultata	37
3.7.1. Izračunavanje koncentracija detektovanih hemijskih elemenata	37
3.7.2. Statistička obrada rezultata	39
IV Rezultati	40
4.1. Intravakuolarni hemijski sastav U937 ćelija	44
4.1.1. Koncentracija gvožđa u fagozomima U937 ćelija koji sadrže	

<i>Mycobacterium avium</i> wt	48
4.2. Hemijski sastav fagozoma koji sadrži <i>Mycobacterium</i> <i>avium pks12</i> mutant	49
4.2.1. Koncentracija gvožđa u fagozomima U937 ćelija koje sadrže <i>Mycobacterium avium pks12</i> mutant	52
V Diskusija	53
VI Zaključci	76
VII Literatura	78

I Uvod

1. *Mycobacterium species*

1.1 Klasifikacija i karakteristike roda *Mycobacterium*

Rod *Mycobacterium* pripada redu *Actinomycetales*, zajedno sa rodom *Streptomyces*. Ova dva roda istog reda su privukla veliku pažnju, zbog krajnje suprotnih efekata koje imaju na ljudsko društvo. Dok su bakterije roda *Streptomyces* izvor antibiotika i drugih terapijskih produkata, pojedini članovi roda *Mycobacterium* su, sa druge strane, izazivači oboljenja kod ljudi i kod životinja (Saxena *et al.*, 2003). Iako je prvobitna filogenetska klasifikacija rodova *Mycobacterium* i *Streptomyces* bila zasnovana pre svega na njihovoj morfologiji, genomske sekvence ovih organizama su potvrdile njihovo zajedničko poreklo (Saxena *et al.*, 2003).

Mycobacterium je jedini rod familije *Mycobacteriaceae*. Okarakterisano je preko 70 vrsta roda *Mycobacterium*, od kojih bar 30 izaziva oboljenja kod ljudi i životinja (Cangelosi *et al.*, 2004). Bakterije roda *Mycobacterium* su blago savijeni ili pravi štapići, koji se ponekada granaju ili formiraju filamente. Mikobakterijski filamenti se razlikuju od filamenata aktinomiceta po tome što se lako fragmentišu u štapiće i kokoidna tela kada su ugrožene. To su aerobne, Gram pozitivne, „acid-fast“ bakterije, koje imaju neuobičajeno visok GC sastav genomske DNK (62-70%), što je karakteristika koju dele sa drugim, filogenetski bliskim *Actinomycetales* (Prescott *et al.*, 1999). Mikobakterije proizvode veliki broj kompleksnih lipida koji ulaze u sastav jedinstvenog ćelijskog omotača ovih



bakterija (Parrish *et al.*, 1999). Čak 60% ćelijskog zida mikobakterija je sazdano od lipida, uključujući i mikolične kiseline koje su karakteristične za mikobakterije i srodne rodove (Wang *et al.*, 2000).

Vrste roda *Mycobacterium* se mogu podeliti u dve grupe: brzorastuće (rastu do sedam dana) i spororastuće (nedelju dana do 6 nedelja), kojima pripada i većina patogenih mikobakterija. Ova deskriptivna podela je prethodila modernim taksonomskim metodama koje su zasnovane na genotipizaciji. Pokazalo se međutim, da je ova podela u skladu sa genotipskom taksonomskom klasifikacijom (Cangelosi *et al.*, 2004).

1.2. Značaj vrsta *Mycobacterium*

Bolesti izazvane mikobakterijama su poznate skoro 1000 godina (McGarvey & Bermudez, 2001). Izolacija *Mycobacterium leprae* kao izazivača lepre 1873. godine i bacila tuberkuloze (*Mycobacterium tuberculosis*) kao uzročnika tuberkuloze 1882. godine, stvorila je nadu da će ova otkrića ubrzo dovesti do iskorenjivanja ovih bolesti. U prvoj polovini XX veka, infekcije izazvane mikobakterijama su bile najintenzivnije proučavane infektivne bolesti (Kolattukudy *et al.*, 1997). Sa početkom upotrebe streptomocina i izoniazida, polovinom prošlog veka u industrijalizovanom delu sveta, broj obolelih od mikobakterijskih oboljenja je počeo da opada, a sa tim i interes za njihovo proučavanje (Kolattukudy *et al.*, 1997). Relativno nedavno, sa pojavom sindroma stečene imunodeficijencije (SIDA), mikobakterijske infekcije su se ponovo pojavile u razvijenim zemljama. Svetska Zdravstvena Organizacija (WHO) je iznela podatke, po kojima je jedna trećina svetskog stanovništva (približno oko 2 milijarde ljudi) već inficirana sa *M.*

tuberculosis i da će se 5-10% njih razboleti; predviđa se da će tokom sledeće decenije oko 30 miliona ljudi umreti od tuberkuloze (Kolattukudy *et al.*, 1997).

Iako je *M. tuberculosis* najagresivnija vrsta ovog roda – uzrokuje veću smrtnost nego bilo koji drugi pojedinačni infektivni agens – i druge mikobakterije izazivaju ozbiljna oboljenja (McGarvey & Bermudez, 2001). Sa stanovišta ljudskog zdravlja, najznačajnije sredinske mikobakterije su kompleks *Mycobacterium avium* i *Mycobacterium ulcerans* (Cangelosi *et al.*, 2004).

1.2.1. *Mycobacterium avium*

Organizmi *Mycobacterium avium* kompleksa (MAC) su ne-tuberkulozne mikobakterije povezane sa infekcijama koje ugrožavaju život ljudi sa već postojećim pulmonarnim oboljenjima (npr. hroničnim opstruktivnim plućnim oboljenjima) ili sa deficijencijom imunskog sistema (npr. stečenim sindromom imunodeficijencije), a ponekada, i ljudi kod kojih ne postoje jasne/vidljive predispozicije (McGarvey & Bermudez, 2001).

M. avium kompleksu pripadaju dve bliske, ali genetički različite vrste - *M. avium* i *Mycobacterium intracellulare* – koje su svrstane u 21 serotipsku grupu (McGarvey & Bermudez, 2001). *M. avium* je dalje klasifikovan u tri podvrste - *M. avium* subsp. *avium* (MAA), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) i *M. avium* subsp. *silvaticum* (Cangelosi *et al.*, 2004). Iako su definisane kao kompleks na osnovu njihovih genetičkih sličnosti, ove tri podvrste *M. avium* su fenotipski prilično različite. MAP je obligatni intracelularni patogen koji izaziva hronični enteritis kod stoke, poznat i kao Jonova

bolest; osim toga *M. avium* subsp. *paratuberculosis* je verovatno etiološki agens Kronove bolesti, hroničnog zapaljenskog oboljenja tankog i/ili debelog creva (McGarvey *et al.*, 2004). *M. avium* subsp. *avium* je primarno sredinski mikroorganizam koji kod ptica izaziva oboljenje slično tuberkulozi, ali je i uzročnik sistemskog oboljenja kod imunokompromitovanih individua. *M. avium* subsp. *silvaticum* je takođe infektivni agens kod ptica, mada se veoma malo zna o njegovoj stvarnoj distribuciji.

M. avium i *M. intracellulare*, dve vrste MAC kompleksa, su izolovani kod pacijenata obolelih od SIDE, ali se frekvencija njihove izolacije razlikuje, kao i način transmisije i tip oboljenja koja izazivaju. Oba mikroorganizma su izolovana iz sputuma ovih pacijenata sa aktivnim pulmonarnim oboljenjima, međutim *M. avium* daleko češće inficira ovu populaciju (McGarvey & Bermudez, 2001). Kod obolelih od SIDE, *M. avium* se prvenstveno unosi preko gastrointestinalnog trakta, gde inficira i prolazi kroz intestinalnu mukozu, a potom inficira i umnožava se u submukoznim makrofazima, izazivajući bakterijemiju koja vodi ka diseminaciji infekcije inficirajući jetru, slezinu i kostnu srž (McGarvey & Bermudez, 2001). Kod većine obolelih od SIDE sistemska infekcija zahvata i respiratorni sistem (Cooper *et al.*, 1998).

Međutim, broj infekcija bakterijama MAC kompleksa koje nisu povezane sa sindromom stečene imunodeficijencije raste, posebno u populaciji starijih ženskih osoba. Većina njih razvija pulmonarna oboljenja (Cooper *et al.*, 1998).

Uprkos različitim domaćinima koje inficiraju i oboljenjima koja uzrokuju, sve patogene mikobakterijske vrste imaju velike sličnosti - preživljavaju unutar fagocita svojih domaćina i indukuju lokalizovani inflamatorni odgovor koji je po svojoj prirodi granulomatozan (Russell *et al.*, 2002).

Iako danas mnogo bolje razumemo interakcije mikobakterija i ćelija domaćina i dalje ostaje mnogo nepoznanica – kritične mikobakterijske komponente koje su vezane na primer, za virulentnost još uvek nisu poznate (Basu, 2004).

1.3. Ulazak i preživljavanje u ćelijama domaćina

M. avium je fakultativni intracelularni patogen, kog intaktni imunski sistem domaćina vrlo brzo uklanja. U odsustvu adekvatne funkcije T ćelija, kao što je slučaj sa HIV1 indukovanom imunodeficijencijom, *M. avium* postaje oportunistička infekcija sa nekontrolisanom replikacijom i reinfekcijom makrofaga domaćina. Osobe sa HIV1 indukovanom imunokompromitovanošću *M. avium* stiču preko crevnog trakta, gde ova mikobakterija prolazi kroz mukoza i inficira submukozne makrofage u *lamina propria*. Odatle se infekcija može raširiti na druga, prijemčiva tkiva. Kod HIV1 negativnih osoba, prijemčivost za pulmonarne infekcije se često javlja u kontekstu pulmonarnih predispozicija (Greenwell-Wild *et al.*, 2002).

Patogene vrste *Mycobacterium* preživljavaju u makrofazima svojih domaćina, što je u potpunoj suprotnosti sa ustanovljenim mišljenjem da ove ćelije predstavljaju efikasnu barijeru bakterijskim infekcijama (Russell, 2001).

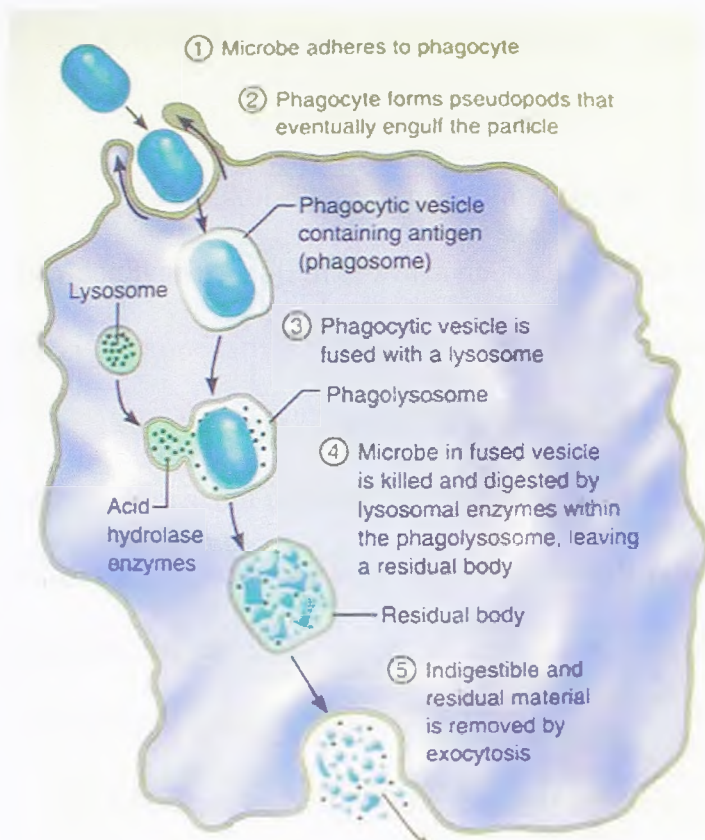
Baš kao i druge patogene mikobakterijske vrste, *M. avium* je razvio strategiju preživljavanja koja interferira sa normalnim unutarćelijskim kretanjem vezikularnih odeljaka/vezikula (Slika 1) (Pais & Appelberg, 2004). Makrofag domaćina fagocitira *M. avium* prvenstveno (ali verovatno ne i isključivo) preko receptora komplementa i C3 komplementom posredovane fagocitoze (Bermudez *et al.*, 1991). Komplementom

posredovana fagocitoza ne aktivira oksidativno sagorevanje („oxidative burst“; stvaranje slobodnih radikala kiseonika) u makrofazima i na taj način omogućava preživljavanje mikobakterija posle fagocitoze (Cangelosi *et al.*, 2004). Po ulasku u makrofag, mikobakterije inhibiraju fuziju vakuole u kojoj su se našle sa lizozomom, blokirajući na taj način sazrevanje fagozoma u fagolizozom. One zatim proliferišu u svojim vakuolama koje zadržavaju karakteristike ranih endozoma (Armstrong & d’Arcy-Hart, 1971; Clemens & Horowitz, 1995; Frehel *et al.*, 1986; Russell *et al.*, 1997). Nekoliko mehanizama inhibicije fuzije vakuola je do sada opisano, kao što su redukcija zakišeljavanja fagozoma (Crowle *et al.*, 1991; Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994; de Chastellier *et al.*, 1995) eliminisanjem vakuolarne H⁻-ATPaze (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994), menjanje signalnih puteva (Malik *et al.*, 2001; Fratti *et al.*, 2003), ometanje recikliranja Rab proteina (Via *et al.*, 1997), zadržavanje aktin-vezujućeg koronin/TACO proteina (Ferrari *et al.*, 1999), remećenje organizacije mreže aktinskih filamenata (Guerin & de Chastellier, 2000) i blisko pozicioniranje membrane vakuole u odnosu na površinu patogena, što dovodi do promena u razmeni faktora fuzije (de Chastellier & Thilo, 1997). Međutim, mikobakterijski fagozomi zadržavaju sposobnost intenzivne interakcije sa endozomima koji mogu da sadrže materijal iz vanćelijskog miljea (Clemens & Horwitz, 1996; Frehel *et al.*, 1986, Russell *et al.*, 1996; Sturgill-Koszycki *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1994). Smatra se da je inhibicija maturacije fagozoma aktivan proces kontrolisan od strane mikobakterija, s obzirom da je samo vijabilne bakterije ostvaruju (Gomes *et al.*, 1999).

M. avium raste i umnožava se u fagozomima sve dok makrofag ne lizira. Ukoliko tako oslobođene bakterije fagocitiraju drugi neaktivirani makrofazi, ciklus rasta,

umnožavanja i fagocitoze se nastavlja neometano sve dok inficirani domaćin ne umre ili aktivira imunski odgovor (Cangelosi *et al.*, 2004). Ukoliko, pak, aktivirani makrofag fagocitira *M. avium* inhibicija fagozom-lizozom fuzije je ometena i bakterije bivaju ubijene. Indukcija imunskog odgovora posredovanog ćelijama je neophodna za kontrolisanje infekcije i kod imunokompromitovanih osoba (npr. kod obolelih od SIDE) ovaj tip odgovora ne funkcioniše efikasno te infekcija nije pod kontrolom (Cangelosi *et al.*, 2004). Dok učestalost MAC infekcija kod obolelih od SIDE sugeriše da zaštita od ovih infekcija zahteva antigen-specifičan odgovor T ćelija, priroda defekta imunskog sistema kod mnogih pacijenata koji nisu oboleli od SIDE ostaje i dalje nejasna. Mada se može povezati sa promenjenom plućnom građom koja bi uticala na imunski odgovor, predispozicija (ili predispozicije) koja dozvoljava da se oportunistička infekcija ostvari i izazove oboljenje nije u potpunosti razjašnjena (Cooper *et al.*, 1998).





Slika 1 – Unutarćelijsko kruženje/kretanje vezikula. Kada makrofag fagocitira bakteriju, formira se vakuola (fagozom) koja prolazi kroz proces sazrevanja. Maturacioni proces čine progresivno zakišeljavanje i nekoliko fisionih događaja (“kiss-and-run”), koji vode ka fuziji sa lizozomom. Na kraju, u potpunosti zreo fagozom sadrži enzime i kiselu sredinu neophodne za denaturaciju i degradaciju fagocitiranog materijala. Ovaj proces je važna komponenta makrofagne odbrane organizma od infektivnih agenasa (Gomes *et al.*, 1999).

Kako zapravo vakuole koje sadrže bakterije ostaju u mreži ranih endozoma još uvek je nedovoljno poznato, iako je nekoliko mehanizama povezanih sa blokadom sazrevanja fagozoma makrofaga do sada opisano, posebno u pogledu kritičnih bakterijskih efektornih molekula uključenih u ovaj proces (Basu, 2004).

1.4. Čelijski zid vrste *Mycobacterium* - karakteristike i uloga

Iako mikobakterije poseduju tipičnu citoplazmatičnu membranu i tanak peptidoglikanski sloj, tu se svaka dalja sličnost sa čelijskim zidom kako Gram-pozitivnih tako i Gram-negativnih bakterija završava (Rhoades & Ullrich, 2000).

Mikobakterijski omotač je jedinstven, kako po svom molekulskom sastavu tako i po arhitektonskom uređenju gradivnih blokova. Jedna od karakteristika mikobakterijskog čelijskog zida je njegov jedinstven sastav – sastoji se od mnogih neuobičajenih lipida koji čine čak 60 % zida, te je, shodno tome, mikobakterijski zid izuzetno hidrofoban (Kolattukudy *et al.*, 1997).

Gledano od citoplazme ka spoljašnjosti, čelijski omotač mikobakterija čine (Camacho *et al.*, 2001):

- 1) plazma membrana;
- 2) čelijski zid (*sensu stricto*) sastavljen od peptidoglikana kovalentno vezanih za heteropolisaharid arabinogalaktan, koji je, pak, estarskom vezom povezan sa masnim kiselinama dugačkih lanaca (C60-C90), nazvanim mikolične kiseline i nekovalentnih lipida i glikolipida. Ovaj kovalentno vezani skelet čelijskog zida se često označava kao mikolično-arabinogalaktansko-peptidoglikanski kompleks;
- 3) kapsula od polisaharida, proteina i lipida. Struktura spoljašnje lipidne barijere je izgleda zajednička za sve mikobakterije, i brzorastuće i spororastuće, no kapsula je bogatija kod spororastućih vrsta, grupe koja uključuje sve važne mikobakterijske patogene. Priroda najudaljenije površine čelijskog omotača je i dalje nepoznata (Draper, 1998).

Mikobakterijski lipidi se mogu podeliti u dve velike grupe: lipide koji se mogu izolovati korišćenjem odgovarajućih organskih rastvarača i lipide čija izolacija zahteva hemijske agense za raskidanje kovalentnih veza. Lipidi koji se mogu izolovati korišćenjem organskih rastvarača uključuju nepolarne lipide, kao što su ftiocerol i njegovi derivati, neesterifikovane masne kiseline, trehalozni monomikolat i dimikolate kao i druge acilovane trehaloze, sulfolipide i trigliceride. Polarni, organskim rastvaračima izolovani lipidi uključuju različite fosfolipide, glikopeptolipide i neke neokarakterisane glikolipide (Parrish *et al.*, 1999).

Struktura ćelijskog omotača je od ogromnog značaja u regulisanju dostupnosti nutrijenata ćeliji, sa jedne strane, i ekskreciji nusprodukata kao i u održavanju barijere za toksične supstance, sa druge strane (Paul & Beveridge, 1994).

Već dugo se misli da je mikobakterijski ćelijski omotač uključen kako u patogenost ovih bakterija tako i u njihovu rezistenciju na nepovoljne sredinske uslove i antibiotike (Camacho *et al.*, 2001). Pored pretpostavljene pasivne uloge, koja se ostvaruje kroz jaku rezistenciju na degradaciju enzimima domaćina, nepermeabilnost za toksične makromolekule i inaktivaciju malih reaktivnih molekula kao što su slobodni radikali kiseonika i azota, moguće je da mikobakterijski ćelijski omotač ima i aktivniju ulogu u patogenezu, pre svega preko interakcije sa receptorima ćelije domaćina koja ubrzava fagocitozu i modulacije imunskog odgovora (Camacho *et al.*, 2001).

Biohemijski i strukturno kompleksni mikobakterijski ćelijski zid je oduvek predstavljao najveću prepreku proučavanju mikobakterija, kao i uspešnoj primeni antimikobakterijskih lekova (Ainsa *et al.*, 2001). Uprkos napretku u razumevanju strukture mikobakterijskog ćelijskog zida, mnogi aspekti biosinteze masnih kiselina i

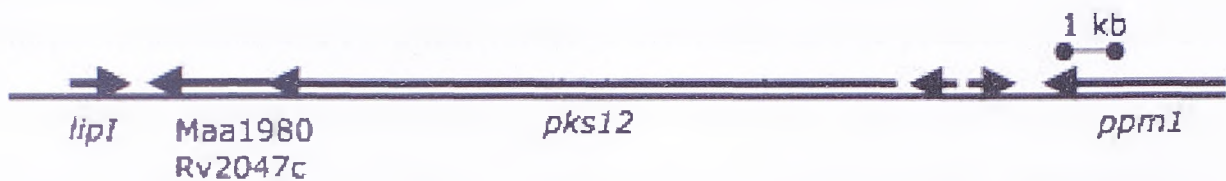
srodnih jedinjenja su i dalje slabo okarakterisani kod ovih organizama (Parrish *et al.*, 1999).

Veliki broj enzima uključen je u biosintezu ogromnog broja veoma različitih lipida prisutnih u mikobakterijama. Shodno tome, nije iznenađujuće što genomska sekvenca mikobakterija otkriva veliki broj gena homologih genima za poliketid sintaze (*pks*) (Kolattukudy *et al.*, 1997). Imajući na umu uloge mikobakterijskog ćelijskog omotača (pasivnu i aktivnu) identifikacija gena uključenih u biosintezu lipidnih komponenti ćelijskog omotača i razjašnjenje enzimologije i molekularne genetike biosinteze ovakvih mikobakterijskih lipida je od ključnog značaja (Kolattukudy *et al.*, 1997). Ovakva istraživanja bi pružila osnovu za razvoj novih lekova čije bi dejstvo bilo usmereno na produkciju unikatnih mikobakterijskih lipida. Osobnost lipida mikobakterijskog ćelijskog omotača čini ih odgovarajućim ciljevima za nove, preko potrebne, antimikrobijske lekove (Kolattukudy *et al.*, 1997)

1.4.1. Poliketid sintaza 12 (*pks12*)

Philalay i saradnici (2004) su, pretražujući biblioteku transpozonskih insercionih mutanata na nemogućnost preživljavanja u prisustvu subinhibitornih koncentracija različitih antibiotika, identifikovali *pks12* gen kao jedan od dva gena neophodna za urođenu (“intrinsic”) multi rezistenciju kod *M. avium*. Na Slici 2 prikazana je genetska mapa *pks12* regiona soja *M. avium* subsp. *avium* 104.





Slika 2 – Genetska mapa *pks12* regiona *M. avium* subsp. *avium* 104 genoma upoređena sa istim regionom *M. tuberculosis* H37Rv. Maa1980 i Rv2047c su genomske oznake gena u *M. avium* subsp. *avium*, odnosno u *M. tuberculosis* genomima (Philalay *et al.*, 2004). *lipI* kodira potencijalnu lipazu dok *ppmI* poliprenol monofosfomanoznu sintazu.

Sa 12 513 baznih parova (bp), ovaj otvoreni okvir čitanja (ORF) je drugi po veličini u genomu *M. avium* subsp. *avium* (Philalay *et al.*, 2004). Pretpostavljeni produkt *pks12* gena sačinjen od 4 170 amino kiselina je po BLAST analizi 80% identičan i 87% homolog Pks12 proteinu *M. tuberculosis*. Homologe sekvence su prisutne i u drugim *Mycobacterium* i *Streptomyces* vrstama kao i kod drugih bakterija (Philalay *et al.*, 2004).

Prema radu Sirakove i saradnika (2003), *pks12* gen *M. tuberculosis* kodira poliketid sintazu neophodnu za sintezu dimikocerosil ftiocerola (DIM), važne komponente ćelijskog omotača nekih patogenih mikobakterija. Nedavno je, međutim, kod *M. tuberculosis* pokazano da je Pks12 protein kodiran *pks12* genom, uključen u sintezu manozil- β -1-fosfodolihola (MPI) (Matsunaga *et al.*, 2004). MPI je prvobitno identifikovan kao retka, ali imunološki potentna fosfolipidna komponenta mikobakterijskog ćelijskog zida koja dovodi do CD1c-posredovanog odgovora humanih T ćelija (Moody *et al.*, 2000).

Visok nivo aminokiselinske identičnosti pretpostavljenog produkta *pks12* gena *M. avium* sa Pks12 produktom *M. tuberculosis* kodiranog *pks12* genom, sugerije sličnu

funkciju, tj. učešće u biosintezi komponenti ćelijskog zida. Koja je uloga *pks12* gena i njegovog produkta kod *M. avium* i dalje je nepoznato, iako je pokazano da njegova inaktivacija vodi ka senzitivnosti ovog mikroorganizma na različite antibiotike, najverovatnije, bar po radu Philalay i saradnika (2004), usled povećane permeabilnosti ćelijskog zida.

1.5. „Signature tagged“ mutageneza

Iako *in vitro* eseji u velikoj meri doprinose razumevanju bakterijske patogeneze, oni veoma često ne mogu da reprodukuju složene sredinske uslove u kojima se patogeni u toku infekcije mogu naći. Shodno tome, informacije koje dobijamo iz ovakvih studija su limitirane. Sa druge strane, rad sa *in vivo* modelima je izuzetno težak. Međutim, nekoliko tehnika, razvijenih u skorije vreme, omogućava istovremeno *in vivo* proučavanje velikog broja gena. Većina ovih metoda se može svrstati u dve grupe – *in vivo* ekspresione tehnike (*in vivo* expression techniques ili IVET) i „signature tagged“ mutagenezu (STM). Dok *in vivo* ekspresionim tehnikama pokušavaju da se identifikuju geni čija je ekspresija indukovana u specifičnim sredinskim uslovima, obično u domaćinu, ST mutageneza zasnovana na kompartivnoj hibridizaciji omogućava dobijanje mutanata koji nisu u mogućnosti da prežive u specifičnim sredinskim uslovima i koristi se za identifikaciju gena koji su neophodni za preživljavanje u domaćinu (Chiang *et al.*, 1999).

„Signature tagged“ mutageneza je komparativna hibridizaciona tehnika koja koristi kolekciju transpozona, u kojoj je svaki transpozon modifikovan inkorporacijom kratkih fragmenata DNK koji sadrže varijabilni region dužine 40 baznih parova, oivičen

nevarijabilnim regionima koje omogućavaju umnožavanje i obeležavanje centralnog regiona PCR reakcijom. Teorijski, svaki pojedinačni mutant se može razlikovati od ostalih po svom jedinstvenom DNK fragmentu prisutnom u transpozonu, odnosno u genomu mutanta. DNK fragmenti sa varijabilnim i nevarijabilnim regionima su prvi put korišćeni za praćenje sudbine različitih ćelija u mešovitoj ćelijskoj populaciji u studiji distribucije neuralnih klonova u cerebralnom korteksu, korišćenjem retrovirusa obeleženih DNK fragmentima različite dužine i drugačijih restrikcionih mapa (Chiang *et al.*, 1999).

U ST mutagenezi, mutirani bakterijski sojevi se čuvaju pojedinačno, obično u bunarčićima mikrotitar ploča (areji – *eng.* „arrays”) i koriste se za „colony“ ili „dot blot“ analize. Pulovi mutanata se koriste za inficiranje životinja, a PCR-om se pripremaju obeležene probe koje predstavljaju DNK fragmente prisutne u preselektivnom pulu (pre infekcije – „input“, tj. ulaz), odnosno u postselektivnom pulu („output“, tj. izlaz; posle prolaska kroz životinju). Hibridizacija DNK fragmenata iz ulaznog i izlaznog pula u „colony“ ili „dot blot“ analizi omogućava identifikaciju mutanata koji ne mogu da prežive selektivni proces, pošto DNK fragmenti koje nose neće biti prisutan u izlaznom pulu. Ovi mutantni sojevi se mogu dobiti iz originalnih areja („arrays“) odakle je moguće utvrditi DNK sekvencu koja okružuje mesto insercije transpozona i identifikovati gen neophodan za *in vivo* virulenciju patogena (Chiang *et al.*, 1999).

Najveća prednost ST mutageneze je to što omogućava direktnu identifikaciju gena uključenih u virulentnost, a ne indirektno, kao što je to slučaj sa *in vivo* ekspresionim tehnikama. Može da se koristi za identifikaciju gena koji su samo prolazno/privremeno ekspimirani ili im je nivo ekspresije veoma nizak. „Signature tagged” mutageneza ne

zavisi od selekcije i relativno ju je lako prilagoditi većini domaćin-patogen sistema (Chiang *et al.*, 1999). Imajući na umu sve prednosti ST mutageneze ova komparativna hibridaciona tehnika je korišćena za dobijanje i identifikaciju *pks12* mutanta koji je proučavan u ovom radu.

2. Sinhrotron i primena sinhrotronske radijacije

Sinhrotron je poseban tip cirkularnog akceleratora subatomske čestice kod koga su magnetno polje (koje usmerava čestice da se kreću kružnom putanjom) i električno polje (ubrzava čestice) pažljivo sinhronizovani sa snopom subatomske čestice.

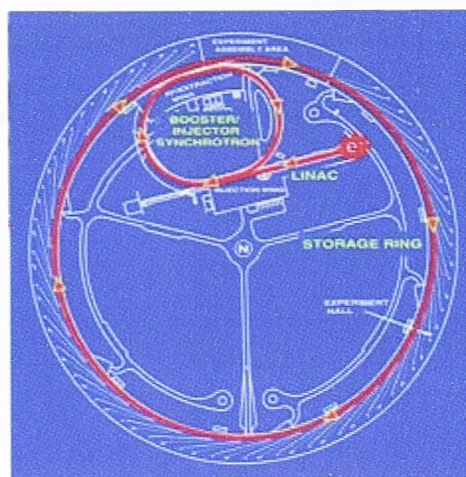
Kada ubrzana naelektrisana čestica (obično elektron), koja se kreće brzinom bliskoj brzini svetlosti duž zakrivljene putanje, interaguje sa magnetnim poljem, emituje se sinhrotronska radijacija. Sinhrotroni mogu da proizvedu dobro kontrolisano elektromagnetno zračenje širokog spektra (infracrveno, vidljivo, ultraljubičasto, X zračenje), mada su često zapravo konstruisani tako da im je dominantno zračenje u oblasti X zraka.

2.1. Prednosti sinhrotronske svetlosti

Sinhrotronska radijacija svoje brojne prednosti duguje sopstvenim jedinstvenim karakteristikama. Najveća prednost sinhrotronske radijacije je njen intenzitet: sinhrotronska radijacija je izuzetno intenzivna, stotinama hiljada puta jača od konvencionalno dobijenih X zraka i veoma kolimisana (elektromagnetni zraci su paralelni). Emituje se u širokom energetsom spektru. Svetlost generisana u sinhrotronu se može relativno lako podešavati, dozvoljavajući, praktično, stvaranje snopa bilo koje energije, odnosno talasne dužine. Sinhrotronska radijacija je visoko polarizovana i emituje se u veoma kratkim intervalima, uglavnom kraćim od nanosekunde.

2.2. Sinhrotronske komponente

Pet glavnih delova sinhrotrona su: 1) linearni akcelerator („linear accelerator“ – „linac“), 2) pojačavački prsten („booster ring“), 3) skladištni prsten („storage ring“), 4) ondulatori („undulators“) i vigleri („wiguers“) i 5) eksperimentalna sala („beamline“, istraživačke stanice itd.) (Slika 3).



Slika 3 – Snimak iz vazduha i šematski prikaz Advance Photon Source (APS), sinhrotronskog postrojenja u Argonne National Laboratory (ANL), u Argonne-u, Illinois, Sjedinjene Američke Države. Linearni akcelerator, pojačavački prsten i skladištni prsten su obeleženi crvenom bojom na šematskom prikazu. Tangentne linije koje se protežu od skladištnog kruga predstavljaju „beamlines“, koji se nalaze u eksperimentalnoj sali. Ondulatori i vigleri nisu prikazani.

Naelektrisane čestice (elektroni) iz linearnog akceleratora, koje se kreću brzinom bliskoj brzini svetlosti i koje su dodatno ubrzane do većih energija u pojačavačkom prstenu, se injektiraju u drugi prsten, nazvan skladištni prsten, koji je pod visokim

vakuumom. Ovde se elektroni ubrzavaju do svojih konačnih energija. Tako ubrzani mogu da se kreću satima. Kada bi elektroni bili prepušteni sami sebi, kretali bi se pravolinijski. Ono što ih tera da kruže u skladišnom prstenu je serija magneta, koji savijaju i kontrolišu njihove putanje (Margaritondo, 2002). Ovi magneti zapravo imaju dvostruku ulogu: pored toga što savijaju putanju elektrona, oni ih takođe prisiljavaju da emituju elektromagnetne talase, tj. sinhrotronsku svetlost (Margaritondo, 2002).

Energija/talasna dužina sinhrotronske radijacije se može podešavati promenom magnetnog polja već pomenutim magnetima, ondulatorima ili wiglerima, koje čine niz dipolnih magneta, što omogućava stvaranje elektromagnetnih talasa kontinuiranog energetskog spektra, od infracrvenih do tvrdih X zraka. Emitovana sinhrotronska svetlost se sakuplja u „beamline“-u i doprema do istraživačkih stanica, gde se koristi u različite svrhe (Margaritondo, 2002).

2.3. Primena sinhrotronske svetlosti

Sinhrotronska svetlost je revolucionarno i višenamensko sredstvo primenljivo u istraživanjima u fizici, hemiji, geologiji, biologiji. Može, između ostalog, da se koristi u proučavanju strukture materije, toka hemijskih reakcija, dizajniranju i proizvodnji malih, veoma preciznih delova i mašina, vizuelizaciji i analizi („imaging“ - imidžingu) materijala i bioloških uzoraka na molekulskom i atomskom nivou.

Izvori sinhrotronske radijacije neprestano pronalaze nove i potpuno neočekivane oblasti primene. Tehnike zasnovane na sinhrotronskoj radijaciji se sve češće koriste u ekološkim studijama. Sličan trend postoji i u geofizici i geochemiji, kao i u arheologiji

(Margaritondo, 2002). Do sada su ove tehnike primenjene i u nekim interesantnim istorijskim istraživanjima – sinhrotronska radijacija i fluorescencija X zraka je nedavno korišćena u istraživanju uzorka kose Ludviga Van Betovena. Rezultati su otkrili neuobičajeno visoku koncentraciju olova, sugerišući dugotrajno trovanje olovom, što je otvorilo neka interesantna istorijska pitanja (Margaritondo, 2002).

2.3.1 Primena u biologiji

Tehnikama zasnovanim na sinhrotronskoj radijaciji mogu se proučavati različiti biološki uzorci. Mnoge proteine i viruse je moguće kristalisati, a zatim odrediti atomsku strukturu pravilnog kristala korišćenjem difrakcije X zraka, sinhrotronske tehnike. Poznavanje trodimenzionalne strukture proteina otvara mogućnost za razvoj novih i boljih lekova.

Sa druge strane, ne formiraju svi biološki materijali kristale, te se druge sinhrotronske tehnike mogu koristiti za njihovo izučavanje. Na primer, tehnika apsorpcije X zraka je nedavno potvrdila pretpostavljeni način skladištenja gvožđa u mozgu (Griffiths et al., 1999). Ovo istraživanje baca novo svetlo na Parkinsonovu bolest i druga degenerativna oboljenja, obzirom da je poznato da oboleli od Parkinsonove bolesti imaju povećanu koncentraciju gvožđa u moždanom tkivu.

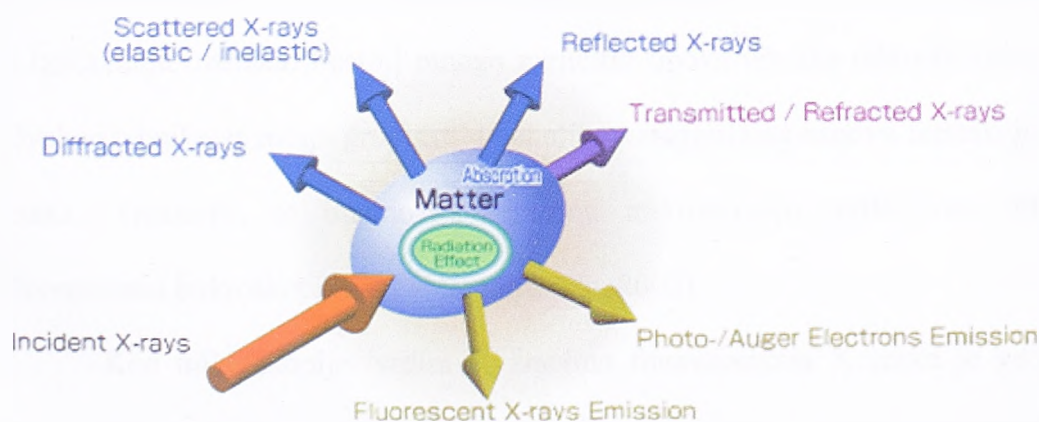
Osim toga, dinamika mnogih važnih biohemijskih procesa, npr. pakovanje proteina, proučavana je tehnikama zasnovanim na sinhrotronskoj radijaciji, kao što je tehnika rasipanja X zraka pod malim uglom. To je moćna metoda za proučavanje

molekularnih interakcija i konformacione fleksibilnosti u rastvorima, što predstavlja osnovu za razumevanje molekulske komunikacije u biološkim sistemima.

Još jedna od tehnika zasnovana na sinhrotronskoj svetlosti nalazi sve veću primenu u biologiji – mikroskopija X zracima.

2.4. Mikroskopija X zracima

Sinhrotroni stvaraju fotone koji se koriste u različitim tehnikama sa širokim spektrom primena. Fotoni interaguju sa atomima, molekulima, čvrstim materijalima i kompleksnim biološkim sistemima na brojne načine. Sinhrotronski fotoni mogu biti apsorbovani, rasuti, bilo elastično ili neelastično, difraktovani, ili pak mogu stimulisati emitovanje elektrona (Slika 4). Svi ovi mehanizmi predstavljaju osnovu mnogim sinhrotronskim tehnikama, među njima i mikroskopiji X zracima (Margaritondo, 2002).



Slika 4 – Interakcije između X zraka i materije.

Mikroskopija X zracima je namenjena vizuelizaciji i kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi („imaging“) uzoraka korišćenjem X zraka (Maser & Vogt, 2003). Mikroskopija X zracima koristi fotone energije od 0,25 keV do 30 keV i više. U zavisnosti od korišćene

energije X zraka, mikroskopija X zracima se deli na mikroskopiju mekim i tvrdim X zracima. Dok u opsegu mekih X zraka korišćene energije padaju ispod jednog kiloelektron volta (keV) (veće talasne dužine), mikroskopija tvrdim X zracima odgovara energijama X zraka koje se kreću iznad jednog keV (Maser & Vogt, 2003).

Mikroskopske tehnike se dalje mogu podeliti na neskenirajuće i skenirajuće. Najjednostavniji primer neskenirajuće tehnike bi bio sledeći - po interakciji sa uzorkom, X zraci dopiru do uređaja za uvećavanje i bivaju detektovani instrumentima kao što je CCD – „couple charged device“ (Margaritondo, 2002).

Uopštena šema skenirajuće mikroskopije X zracima izgleda ovako – instrument za fokusiranje usmerava snop X zraka na veoma mali deo uzorka. Potom se pozicija fokalne tačke na uzorku menja pomeranjem uzorka. Detektor meri intenzitet X zraka emitovih iz svake tačke uzorka i na osnovu toga kompjuterski se generišu dvodimenzionalne slike (Margaritondo, 2002).

I skenirajuća i neskenirajuća mikroskopija koriste različite kontrastne mehanizme u izučavanju uzoraka. Postoji mnogo različitih tipova tehnika mikroskopije X zracima. Ovakve tehnike se mogu grupisati u nekoliko kategorija na osnovu interakcija između X zraka i materije, te imamo apsorpcionu mikroskopiju, reflektivnu mikroskopiju, fluorescentu mikroskopiju, itd (Margaritondo, 2002).

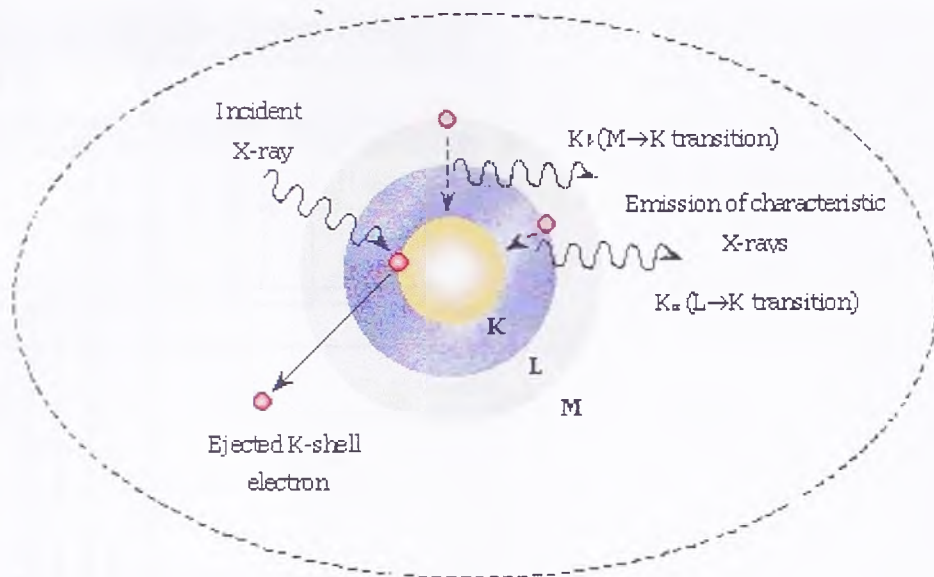
Kod mikroskopije tvrdim X zracima fluorescencija X zraka je veoma moćan kontrastni mehanizam, koji omogućava analizu elemenata u uzorku na atogramskom (10^{-16} g) nivou (Maser & Vogt, 2003).

2.4.1. Fizičke osnove X zracima indukovane fluorescencije X zraka

Elektron može biti izbačen iz svoje atomske orbitale ukoliko apsorbira foton dovoljne energije. Energija fotona mora biti veća od energije vezivanja elektrona za nukleus atoma. Kada je elektron iz unutrašnje orbitale izbačen iz atoma, jonizovani atom je u visoko ekscitiranom stanju i brzo prelazi u niže energetske stanje na jedan od dva načina – Auger-ovom (Ožerovom) emisijom ili fluorescencijom X zraka. U procesu deekscitacije, bez obzira na način na koji se odvijao, elektron iz spoljašnje orbitale će preći na unutrašnju da popuni upražnjeno mesto.

U neradijacijskom procesu Ožerove tranzicije, energija koja je dobijena prelaskom elektrona iz spoljašnje na unutrašnju orbitalu se prenosi na drugi elektron iste ili neke druge orbitale. Potom taj elektron biva izbačen/emitovan sa karakterističnom takozvanom Ožerovom energijom, stvarajući tako duplo jonizovan atom. Ovaj proces dominira kod lakih elemenata (kao što su natrijum, fosfor, sumpor, hlor).

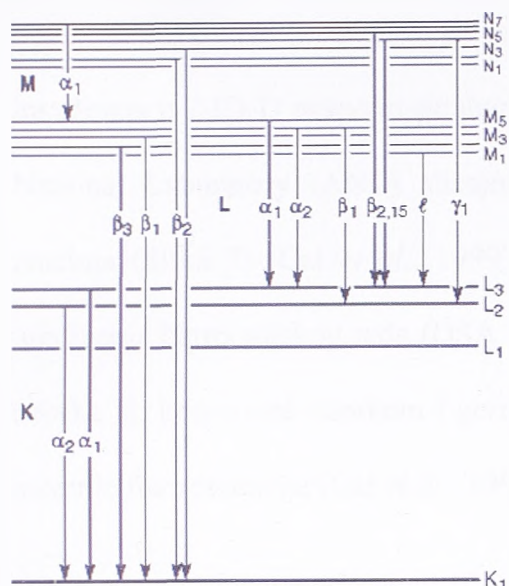
Sa druge strane, proces deekscitacije jonizovanog atoma se može ostvariti emitovanjem karakterističnog fotona u procesu poznatom kao X zracima indukovana fluorescencija X zraka (Slika 5). Energija emitovanog fotona je jednaka razlici u energijama između dve orbitale koje zauzima elektron koji vrši prelaz. Kako je energetska razlika između dve određene orbitale datog elementa uvek ista (tj. karakteristična za svaki element), foton emitovan pri prelazu između dva nivoa uvek ima istu energiju. Prema tome, određivanjem energije fotona, kog emituje određeni element moguće je identifikovati taj element.



Slika 5 – Princip fluorescencije X zraka. K, L i M su atomske orbitale; crveni kružići su elektroni, dok sinusoide predstavljaju bilo upadne, bilo emitovane X zrake (fotone).

Za određenu energiju emitovane fluorescentne svetlosti nekog elementa, broj fotona u jedinici vremena je proporcionalan količini tog elementa u uzorku. Shodno tome, određivanjem energije emitovanih X zraka u spektru uzorka i izračunavanjem broja emitovanih karakterističnih linija za svaku detektovanu emitovanu energiju, moguće je kvalitativno utvrditi sastav uzorka kao i kvantifikovati koncentracije detektovanih elemenata.

Emisione linije X zraka (fluorescentne linije) se obično obeležavaju kao K_{α} , K_{β} , L_{α} , ili L_{β} . K i L oznake se odnose na orbitalu u kojoj je mesto upražnjeno, dok se α i β odnose na poreklo elektrona koji popunjava prazninu. Alfa označava najbližu orbitalu, beta prvu sledeću i tako dalje. Tako da K_{α} emisija predstavlja energiju X zraka emitovanu kada L elektron popuni rupu u K orbitali, a K_{β} linija predstavlja emitovanje X zraka pri prelasku M elektrona na K orbitalu (Slika 6).



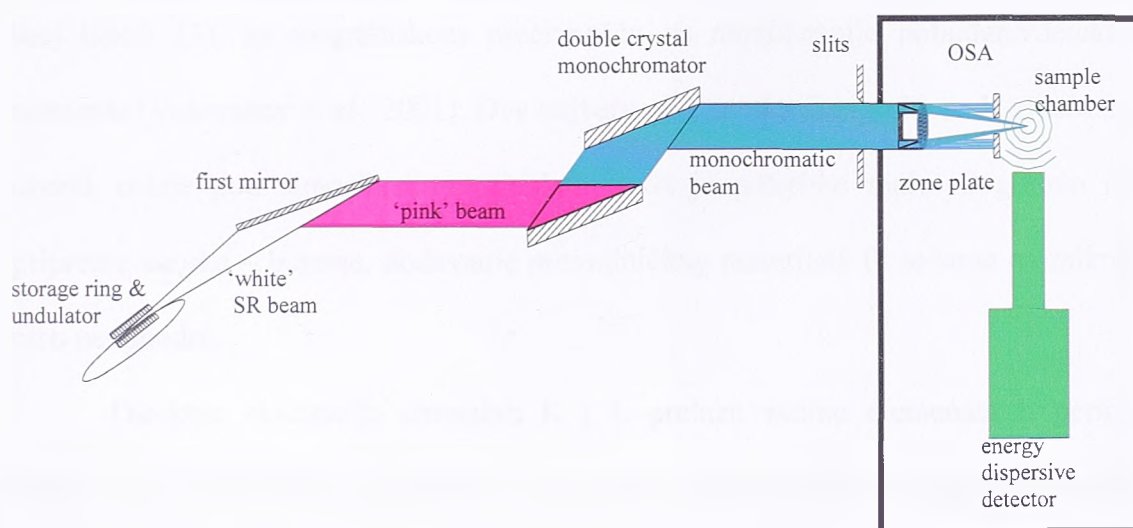
Slika 6 – Elektronski prelazi i odgovarajuće emisijske linije (X-ray data booklet, Grupa autora, 2001, Lawrence Berkeley National Laboratory).

Verovatnoća da će se deeskicacija pobuđenog atoma odigrati emitovanjem X zraka je data fluorescentnim prinosom, i raste sa porastom atomskog broja elementa (Maser & Vogt, 2003).

2.4.2. Mikroproba sa tvrdim X zracima – Mikroskop sa X zracima

Jedna od osnovnih postavki mikroskopa sa X zracima je skenirajuća mikroproba sa X zracima gde je X zracima indukovana fluorescencija X zraka kontrastni mehanizam izbora u proučavanju distribucije elemenata u biološkim i drugim uzorcima (Maser & Vogt, 2003). Mikroproba sa tvrdim X zracima, pored mikroskopije sa submikronskom rezolucijom može se koristiti i za utvrđivanje oksidacionog stanja elemenata i lokalnih strukturnih karakteristika uzorka, korišćenjem različitih kontrastnih mehanizama.

Mikroproba sa tvrdim X zracima („the hard X-ray microprobe“ - HXRM) instalirana u 2-ID-D eksperimentalnoj stanici u Advance Photon Source (APS), Argonne National Laboratory (ANL), dizajnirana je i razvijena za primenu mikroskopije X zracima (Slika 7) (Cai *et al.*, 1999). HXRM čine Freznelove zonske ploče, otvor za uređivanje harmonijskog reda (OSA – „order-sorting aperture“), konstrukcije za držanje uzorka, tj. komore sa uzorkom i germanijumski (Ge) energetsko-disperzivni detektor za merenje fluorescencije (Cai *et al.*, 1999).



Slika 7 – Šematski prikaz mikroprobe sa tvrdim X zracima, sektora 2, 2-ID-D stanice, u Advance Photon Source. Sama mikroproba je uokvirena podebljanom linijom. Ondulator je korišćen kao izvor X zraka velikog intenziteta, obezbeđujući X zrake energetskog opsega od 4-40keV (beli snop), koje se mogu podešavati. Ogledalo služi kao niskopropusni filter – propušta samo zračenje ispod 32keV (pink snop) i štiti nizvodne optičke komponente od pregrevanja. Monohromator se koristi za selektovanje energije fotona u opsegu od 4-30keV. Freznelove zonske ploče fokusiraju snop na uzorak. OSA, otvor za uređivanje harmonijskog reda („order-sorting aperture“) je pozicionirana blizu uzorka da bi redukovala pozadinsko zračenje. Uzorak se nalazi na mrežici za elektronsku mikroskopiju, koja je fiksirana na specijalnom držaču za uzorke. Uzorak se skenira kroz snop X zraka. X zracima indukovane fotone poreklom iz uzorka sakuplja detektor („energy dispersive detector“). Elektronski instrumenti koji slede (nisu prikazani) analiziraju detektovane fotone i daju ceo fluorescentni spektar za svaki skenirani delić uzorka.

Mikroproba sa X zracima je jedna od svega nekoliko tehnika koje omogućavaju detekciju elemenata u tragovima u mikro zapreminama (Baker & Anderson, 2000). Ona pruža jedinstvenu kombinaciju istovremene analize više elemenata sa submikronskom prostornom rezolucijom i visokom senzitivnošću i suštinski nedestruktivnog pristupa. Oštećenja uzorka su minimalna, jer je fluorescencija X zraka proizvedena ekscitacijom sa veoma precizno podešenim (monohromatskim) X zracima, a ne sa brzim elektronima (kao što je to slučaj kod elektronske mikroskopije). Tehnika je posebno cenjena zbog mogućnosti kvantitativne analize praktično svih elemenata sa izuzetkom lakih (atomski broj ispod 13), sa atogramskom preciznošću za najefikasnije pobuđene/detektovane elemente (Vekemans *et al.*, 2001). Dve najveće prednosti mikroprobe sa X zracima su da uzorak ostaje pod atmosferskim pritiskom i da je potrebno malo ili gotovo nimalo pripreme uzorka – bojenje, dodavanje provodničkog materijala ili sečenje na mikrotomu nisu neophodni.

Direktna ekscitacija atomskih K i L prelaza većine elemenata u periodnom sistemu (od kalcijuma do uranijuma) je moguća podešavanjem energije incidentnog X zraka na željenu vrednosu u rasponu od 4 do 30 keV (Maser *et al.*, 2003). Lakši elementi, kao što su natrijum, fosfor, sumpor i hlor, kod kojih preovladava neradijativni proces (Ožerova emisija), se ipak i dalje ekscitiraju relativno dobro (Slika 8) (Maser & Vogt, 2003). Prodornost X zraka energije između 4 – 30 keV se kreće u rasponu od nekoliko stotina mikrometara do nekoliko milimetra, tako da cele ćelije mogu biti skenirane bez potrebe za sečenjem na mikrotomu. Apsorpciona dužina za fotone koje emituju biološki važni elementi (počevši od fosfora, sumpora, hlora, kalijuma, kalcijuma,... gvožđa... pa

sve do bakra i cinka; Slika 8) iznosi 10 mikrometara i više. Prema tome, samoapsorpcija nema značajnu ulogu u kvantifikaciji izmerenih koncentracija (Maser *et al*, 2003).

1																	2										
H																	He										
3	4											5	6	7	8	9	10										
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne										
11	12											13	14	15	16	17	18										
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar										
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36										
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr										
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54										
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe										
55	56	57	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86										
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn										
87	88	89	104	105	106	107	108	109	110																		
Fr	Ra	Ac	Rf	Ha	Sg	Ns	Hs	Mt	Uun																		
														58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
														Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
														90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103
														Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr

Slika 8. Periodni sistem elemenata. Sa incidentom fotonskom energijom od 10 keV moguće je detektovati i kvantifikovati cink i elemente sa nižim atomskim brojem, uključujući najveći broj elemenata od biološkog značaja, koji su na ovoj slici uokvireni crvenom linijom.

2.4.2.1. Primena mikroprobe sa tvrdim X zracima u biomedicinskim istraživanjima

Sve veći broj bioloških studija ukazuje na značaj metala kako u održavanju zdravlja tako i u patogenezi različitih bolesti kao što su neurodegenerativna oboljenja, rak itd. Procenjeno je da trećina svih poznatih proteina ima metal kao kofaktor i da većina njih funkcioniše kao esencijalni metaloenzimi. Bakterijska ćelija ima iste potrebe za metalima kao i eukariotska – metali imaju centralu ulogu u mnogim ćelijskim procesima bakterija, s obzirom da su oni kofaktori u mnogim osnovnim metaboličkim putevima, kao

i da su kofaktori mnogim metaloenzimima. Elementi u tragovima, sa druge strane, predstavljaju sredinske faktore koji regulišu faktore virulencije kod mnogih patogenih bakterija i shodno tome su značajni za njihovu patogenezu, kao i za razvoj i ozbiljnost bolesti koju izazivaju (Wagner *et al.*, 2005a; Wagner *et al.*, 2005b). Poslednjih godina postalo je očigledno da metali vezani ili nevezani za proteine, imaju važnu ulogu u signalizaciji i kontroli mnogih ćelijskih procesa. Prema tome, poznavanje i kvantifikacija njihove distribucije unutar ćelije su veoma važni. Iako postoje metode koje omogućavaju lokalizaciju pojedinih metala u ćelijama (na primer, elektronska mikroskopija uzoraka debljine manje od 100 nm ili fluorescentno obeležavanje i fluorescentna mikroskopija u vidljivom delu spektra), one ne dozvoljavaju senzitivnost i stepen lokalizacije i kvantifikacije koje pruža mikroskopija X zracima, bez potrebe za dodatnim bojenjem uzoraka, koje može indukovati pojavu artefakata (Maser & Vogt, 2003). Većina pak analitičkih metoda sa velikom prostornom rezolucijom – kao što su elektronske i protonске mikroprobe – koriste sisteme pod visokim vakuumom, koji više nego sigurno menja ćelijski materijal i lokalizaciju elemenata (Kemner *et al.*, 2004). Korišćenjem fluorescentne mikroskopije X zracima, moguće je sa velikom osetljivošću i velikom prostornom rezolucijom proučavati sastav i hemijsko stanje elemenata u tragovima u biološkim sistemima, što su osnovni zahtevi za istraživanja usmerena ka razumevanju kompleksnih unutarćelijskih procesa koji uključuju metale.

Fluorescentna skenirajuća mikroskopija X zracima je jedinstvena tehnika koja omogućava određivanje distribucije i kvantifikaciju hemijskih elemenata u biološkim uzorcima (Maser *et al.*, 2003). Po prvi put je moguće određivanje apsolutne koncentracije i distribucije metala u pojedinim biološkim materijalima (Kidd *et al.*, 2005; Wolford *et*

al., 2005). Prema tome, korišćenje mikroprobe sa X zracima predstavlja jedinstven pristup definisanju sredinskih uslova unutar vakuola koje sadrže patogen.

II Cilj rada

Mycobacterium avium je intracelularni patogen koji inficira i replicira se u ćelijama prve linije odbrane organizma od bakterijskih infekcija i čiji uticaj na ljudsko zdravlje poprima sve veći značaj. Iako sve veći broj studija pokazuje da je koncentracija elemenata u tragovima i drugih neorganskih jona jedan od faktora koji regulišu ekspresiju gena za virulentnost kod brojnih patogena, postoji veoma malo informacija o njihovoj koncentraciji u intracelularnim odeljcima u kojima se mogu naći patogeni. S toga su u ovom radu definisani sledeći ciljevi:

1. Koristeći mikroprobu sa tvrdim X zracima analizirati koncentracije hemijskih elemenata u fagozomima U937 ćelija, modelu za humanu mikobakterijemiju, koje su inficirane *M. avium* wt i njegovim *pks12* mutantom, 1 h i 24 h posle infekcije.

2. Definirati mikrosredine unutar endozom-lizozom sistema ćelija domaćina za *M. avium* wt i *M. avium pks12* mutant i uporediti sa mišijim modelom, kao i utvrditi da li postoje razlike u koncentraciji hemijskih elemenata između fagozoma koji sadrže wt, odnosno njegov atenuirani *pks12* mutant, uz demonstraciju značaja i mogućnosti novog pristupa proučavanju intracelularnog života patogena.

III Materijal i metode

3.1. Bakterijski sojevi

U ovom radu su korišćeni *Mycobacterium avium* soj 104, klinički izolat, prethodno opisan kod Bermudez *et al.* (1997), izolovan iz krvi pacijenta obolelog od SIDE i *Mycobacterium avium pks12* mutant istog soja, dobijen „signature tagged“ mutagenezom, poklon od Prof. Luiza E. Bermudeza.

3.2. Čelijska linija

U ovom radu korišćena je humana čelijska linija, U937, dobijena od difuznog histocitičnog limfoma (ATCC kolekcija), model za humanu mikobakterijemiju.

3.3. Uslovi gajenja

3.3.1. Kultura mikobakterija

Bakterije su gajene na Middlebrook 7H11 agaru sa dodatkom oleinske kiseline, albumina, dekstroze i katalaze (Middlebrook 7H11 agar OADC Enrichment; Difco) na 37°C deset dana.

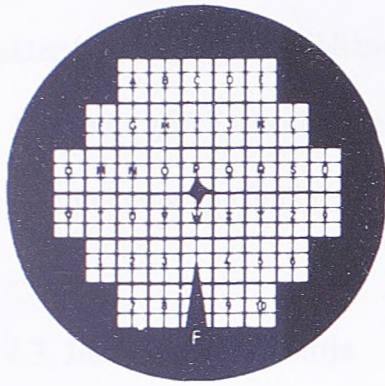
3.3.2. Kultura U937 ćelija

U937 ćelije su gajene u RPMI-1640 medijumu, sa dodatkom 10% temperaturno inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma (FBS; Sigma Chemicals) na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂.

3.4. Priprema uzoraka

3.4.1. Zasejavanje U937 ćelija na mrežice („finder grid“)

U937 ćelije su zasejavane na sterilne, 200 Mesh London Finder zlatne mrežice obložene formvarom (sintetički izolator koji sadrži polivinilacetat i fenolna zrnca; pravljene po narudžbi; Electron Microscopy Sciences) (Slika 9), koje su se nalazile u bunarčiću mikrotitar ploče (4-5 mrežica po bunarčiću), u RPMI-1640 medijumu sa dodatkom 10% inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma. Tako zasejane ćelije su rasle 18-24 h u već opisanim uslovima.



Slika 9 - 200 Mesh London Finder mrežica. Mrežica je podeljena na pravougaona polja, od kojih je svako obeleženo slovom, brojem ili simbolom. Pravougaonik je dalje podeljen na šest jednakih kvadrata što omogućava lako pronalaženje ćelija odabranih za analizu.

3.4.2. Određivanje gustine bakterija McFarland-ovim standardom

Bakterije korišćene za infekciju ćelija su resuspendovane u Hank balansiranom sonom rastvoru (HBSS), snažno promućkane i ostavljene 30 minuta do 1 h da se agregati stalože. Broj bakterija u supernatantu, koji je korišćen za infekciju, je podešavan korišćenjem McFarland-ovog standarda. Prvobitni McFarland-ov standard je pravljen mešanjem barijum hlorida i sumporne kiseline, pri čemu se formira barijum sulfat koji precipitira. U ovom radu je korišćen McFarland-ov standard sa partikulama lateksa, čime je povećana stabilnost suspenzije, u odnosu na prvobitni. Radi lakšeg poređenja, standard i suspenzija bakterija se porede nasuprot belog papira na kom su iscrtane crne linije. Ukoliko bakterijska suspenzija nije dovoljno turbidna (gusta), odnosno manjeg je turbiditeta od standarda (broj bakterija je niži od željenog), bakterijska turbidnost, tj. broj bakterija u suspenziji je podešavan dodavanjem bakterijske suspenzije. Suviše velika turbidnost bakterijske suspenzije je podešavana do željene dodatkom rastvora soli

(HBSS). McFarland-ov 0,5 standard koji je korišćen za aproksimativno određivanje broja bakterija u suspenziji, približno odgovara homogenoj suspenziji *E. coli* koja broji oko $1,5 \times 10^8$ ćelija (McFarland 1 standard = 3×10^8 ćelija). Koliko je bakterija korišćeno za infekciju humanih U937 ćelija zavisilo je od broja U937 ćelija na mrežicama.

3.4.3. Infekcija U937 ćelija

Monolejeri U937 ćelija su inficirani *M. avium* wt i *M. avium pks12* mutantom jedan sat, sa približnim odnosom od 10 bakterija po makrofagu. U toku tih sat vremena dolazi do fagocitoze. Ćelije su po isteku tog vremena ispirane dva puta HBSS-om da bi se uklonile preostale ekstracelularne bakterije (i time sprečila naknadna fagocitoza) i dodavan je svež medijum. Od ovog trenutka računato je vreme infekcije.

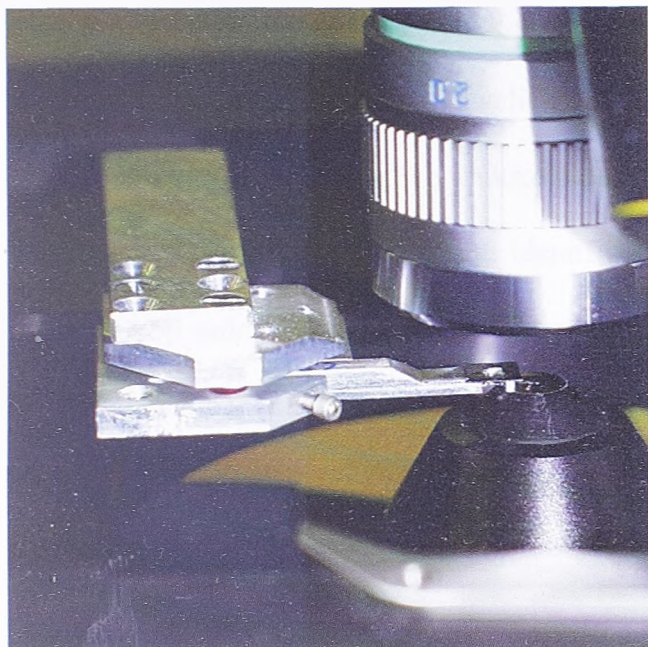
Po isteku jednog, odnosno dvadeset i četiri sata, makrofazi su ponovo ispirani dva puta HBSS-om i potom fiksirani u 1% paraformaldehidu 30 minuta. Fiksativ, paraformaldehid (Sigma), pH7,2, je rastvoren u destilovanoj i dejonizovanoj vodi, tretiranoj sa Chelex 100 zrcima (Biorad) i potom profiltriranom. Paraformaldehid je čuvan u plastičnoj posudi da bi se izbeglo „curenje“ jona iz zidova staklene posude, čije bi prisustvo onemogućilo određivanje stvarne koncentracije hemijskih elemenata u uzorku. Po završenom fiksiranju, mrežice su isprane dva puta u HBSS-u, potom kratko u sterilnoj vodi, osušene na vazduhu i potom stavljene u posmatračke komorice („viewing chambers“) (Electron Microscopy Science) za mikroskopsku identifikaciju fagozoma koji sadrže bakterije.

3.5. Optička mikroskopija

Pre mikroskopiranja X zracima („X ray imaging“), makrofazi u komoricama za posmatranje su pregledani pod mikroskopom (Nikon) sa A PlaApo 60 x/1.3 imerzionim sočivom i za dalju analizu odabirani su makrofazi sa fagozomima koji su sadržali bakterije. Pojedinačne mrežice, koje sadrže odabrane makrofage, su potom prebacivane na precizne držače uzoraka, koji su mogli da se koriste i na optičkom mikroskopu i u mikroprobi (slika 10).

Diferencijalno interferentnom kontrastnom mikroskopijom (DIC; 100 x uvećanje) i fazno kontrastnom mikroskopijom sa suvim sočivima na Leica DMXRE optičkom mikroskopu, određivane su koordinate centra prethodno odabranih makrofaga i pojedinačnih fagozoma koji su sadržali bakterije. Ove koordinate su kasnije korišćene za precizno pozicioniranje uzoraka u mikroprobi sa tvrdim X zracima. Optičkom mikroskopijom izmerene koordinate predstavljaju relativne pozicije makrofaga i fagozoma od interesa, merene u odnosu na izabranu referentnu tačku na mrežici (kao što je na primer, najbliži ugao kvadrata na mrežici u kojoj se nalazi odabrani makrofag).

Potom su mrežice prebacivane u mikroprobu sa tvrdim X zracima, gde je položaj makrofaga i fagozoma pronalazen na osnovu njihovih relativnih koordinata izmerenih optičkom mikroskopijom (X zraci „vide“ samo „prečke“ mrežice). Zahvaljujući preciznom držaču uzoraka (specijalno dizajniran i izrađen za potrebe ovih eksperimenata), koji se koristi i u optičkoj i u mikroskopiji X zracima, postignuta je ponovljivost pozicioniranja izabranih fagozoma od 1-2 μm , između ova dva mikroskopa.



Slika 10 – Držać uzoraka sa uzorkom u optičkom mikroskopu.

3.6. Mikroskopija tvrdim X zracima

Mikroproba sa tvrdim X zracima je korišćena za dobijanje kvantitativnih mapa distribucije hemijskih elemenata u makrofazima i fagozomima koji sadrže bakterije. U sredini u kojoj se uzorak nalazi, u komori za uzorke mikroprobe, vazduh je zamenjen helijumom. Zamena atmosfere u kojoj se nalazi uzorak omogućava smanjenje fluorescencije koja potiče od gasa argona (0,9 % vazduha čini ovaj inertni gas), koja može da utiče na signal koji potiče od hlora kao i da poveća transmisiju karakteristične fluorescentne radijacije elemenata sa nižim atomskim brojem kao što su natrijum, fosfor i sumpor. Izabrana energija incidentnih fotona (X zraka) od 10 keV dozvoljava merenje koncentracije cinka i elemenata sa nižim atomskim brojem.

Korišćenjem motora čiji se koraci pomeranja mogu definišati i kontrolisati, uzorak se pozicionira u položaj koji definišu prethodno izmerene x/y koordinate

(optičkim mikroskopom) i prvo je skeniran ceo makrofag – takozvani preliminarni sken (veličina skena $30 \times 30 \mu\text{m}$) - sa veličinom koraka od $1 \times 1 \mu\text{m}$. Ovakav krupan sken omogućava preklapanje optičke mikroskopske slike i skena makrofaga i, zajedno sa izmerenim koordinatama, daje jasnu identifikaciju regiona koji sadrže fagozome. Svaki fagozom koji sadrži bakteriju, na osnovu prethodno izmerenih koordinata, je pozicioniran u fokalnu tačku X zraka i skeniran sa visokom rezolucijom – veličina skena - $3 \times 3 \mu\text{m}$, sa koracima veličine $0,1 \times 0,1 \mu\text{m}$. Da bi se postigla zadovoljavajuća statistika fotona, koja je neophodna da bi se odvojio signal mikobakterijskog fagozoma od signala samog makrofaga, svaka tačka je skenirana po 10 sekundi. Za sve uzorke prikupljeni su kompletni spektri fluorescencije X zraka za svaku skeniranu tačku skena, korišćenjem energetsko-disprezivnog germanijumskog (Ge) detektora.

3.7. Analiza rezultata

3.7.1. Izračunavanje koncentracija detektovanih hemijskih elemenata

Mape hemijskih elemenata uzoraka su dobijene iz spektara fluorescentnih X zraka korišćenjem softverskog paketa MAPS (Vogt, 2003; Vogt *et al.*, 2003). Da bi se izmereni spektri X zraka kvantifikovali, mikroproba je kalibrisana korišćenjem NIST (National Institute of Standards and Technology) tankoslojnih standarda (National Bureau of Standard (NBS) 1832 and NBS1833) pre, u toku i po završetku svakog eksperimenta. Kalibraciona kriva je dobijena iz kalibracionih standarda i potom korišćena u kvantifikaciji svih elemenata od natrijuma do cinka. Direktno je korišćena u kvantifikaciji

sledećih elemenata – silicijum, kalcijum, kalijum, titan, volfram, mangan, kobalt, bakar, gvožđe i cink, dok je interpolacija primenjena za fosfor, sumpor, hlor, hrom i nikl, a ekstrapolacija za natrijum i magnezijum.

Nezavisno od vrste mikobakterije, upoređivanje mikroskopskih slika i skenova je pokazalo da je bakterija u makrofagu oivičena distribucijom hlora ili kalijuma. Ovi elementi su stoga korišćeni kao jedan od parametara (zajedno sa mikrografijom dobijenom optičkom mikroskopijom) za precizno definisanje fagozom-bakterijskog regiona od interesa. Na istom skenu definisan je i region neposredno pored fagozoma - pozadinski region (ćelijski „background”), koji predstavlja citoplazmatični sadržaj u neposrednoj blizini (400-600 nm) fagozoma, pri čemu su izbegavane makrofagne strukture vidljive bilo optičkim mikroskopom ili detektovane u skenovima različitih elemenata za isti fagozom, koje bi mogle da utiču na vrednosti ćelijskog regiona od interesa.

Prosečan sastav hemijskih elemenata za svaku mikobakteriju je izračunavan na sledeći način: za svaki sken su definisani region mikobakterije i region koji predstavlja lokalni ćelijski „background”. Posle podešavanja srednjih vrednosti spektara i poređenja sa kalibracionom krivom, neobrađene („raw”) koncentracije elemenata su izračunavane za svaki mikobakterijski region i svaki definisani pozadinski region. Ukupan sadržaj hemijskih elemenata za svaku mikobakteriju je izračunavan oduzimanjem pozadinskog sadržaja ćelije, tj. ćelijskog „background”-a od sadržaja date bakterije.

Dobijeni rezultati su predstavljeni kao gustina površine („area density”) i izraženi su u $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Ove vrednosti su preračunate u koncentracije izražene kao mM/l ili $\mu\text{M}/\text{l}$ korišćenjem molarne mase odgovarajućeg elemenata i debljine mikobakterije, za koju je

pretpostavljeno da iznosi 1 μm (nezavisna merenja debljine bakterije nisu bila moguća). Pri fiksiranoj energiji ekscitacije (10 keV), osetljivost merenja je redukovana za lakše elemente kako zbog manjeg prinosa njihovih fluorescentnih X zraka, tako i zbog apsorpcije uzorka. Stoga je bilo moguće detektovati samo relativno visoke koncentracije fosfora, sumpora i hlora. Osetljivost za natrijum i magnezijum je još manja, dok je osetljivost za elemente u tragovima kao što su gvožđe, mangan, bakar i cink veoma velika (to su elementi sa većim atomskim brojem, u odnosu na pomenute čija je detekcija manje efikasna; korišćena energija incidentnih X zraka efikasnije ih pobuđuje).

3.7.2. Statistička obrada rezultata

Statistička analiza promena koncentracija hemijskih elemenata je urađena poređenjem koncentracija odgovarajućih elemenata u određenoj vremenskoj tački između različitih grupa (npr. *M. avium* wt nasuprot *M. avium pks12* mutant) i unutar grupe (1 h nasuprot 24 h) korišćenjem Studentovog *t*-testa. *P*-vrednosti manje od 0,05 su smatrane statistički značajnim.

IV Rezultati

Za direktno merenje koncentracije hemijskih elemenata unutar fagozoma koji sadrži mikobakteriju, korišćena je mikroproba sa tvrdim X zracima suboptičke rezolucije. Ovaj sistem omogućava određivanje distribucije i koncentracije elemenata u tragovima i drugih elemenata u uzorku, analiziranjem karakterističnih spektara fluorescentnih X zraka, bez dodatnog bojenja.

S obzirom na značaj koji imaju infekcije mikobakterijama na humanu populaciju u ovom radu je izučavana infekcija U937 ćelija bakterijom *Mycobacterium avium*.

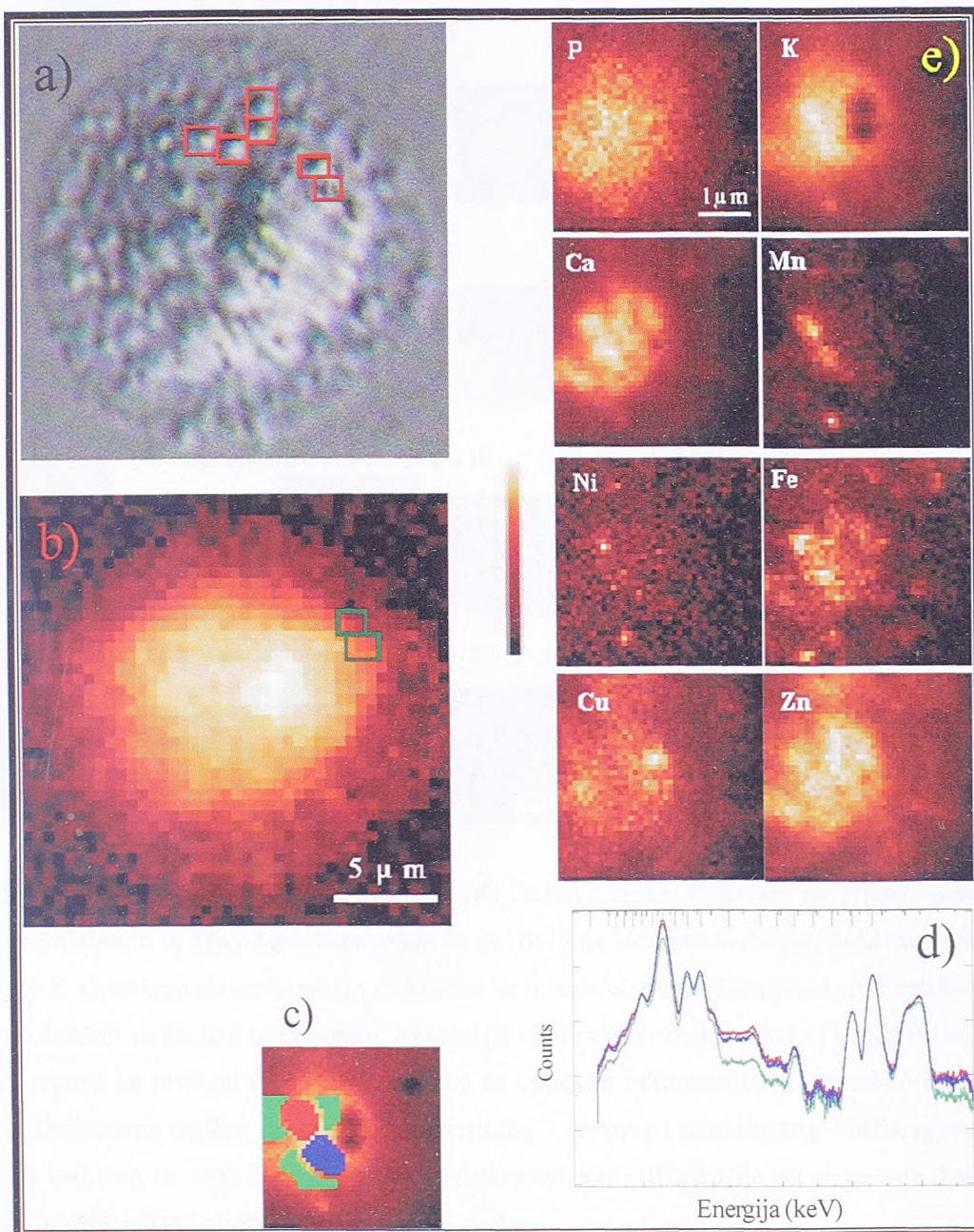
Eksperimenti su urađeni sa makrofazima inficiranim *M. avium* wt i njegovim *pks12* mutantom, 1 h i 24 h posle infekcije. Merenja su vršena u istim vremenskim intervalima kao i u prethodnim eksperimentima (sa mišijim peritonealnim makrofazima) u kojima su detektovane značajne razlike u koncentracijama nekoliko elemenata u različitim, kako patogenim, tako i nepatogenim vrstama mikobakterija (Maser *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2005a).

Za svaki uzorak i svaku vremensku tačku pripremano je osam do devet mrežica sa inficiranim ćelijama. Svaka od njih je detaljno pregledana (50-100 makrofaga po mrežici), a potom su odabirani makrofazi koji su dalje analizirani. Pri odabiru makrofaga i identifikaciji njihovih fagozoma za analizu, neophodno je voditi računa o položaju makrofaga na mrežici, tačnije o njihovoj udaljenosti od „prečki“ mrežice.

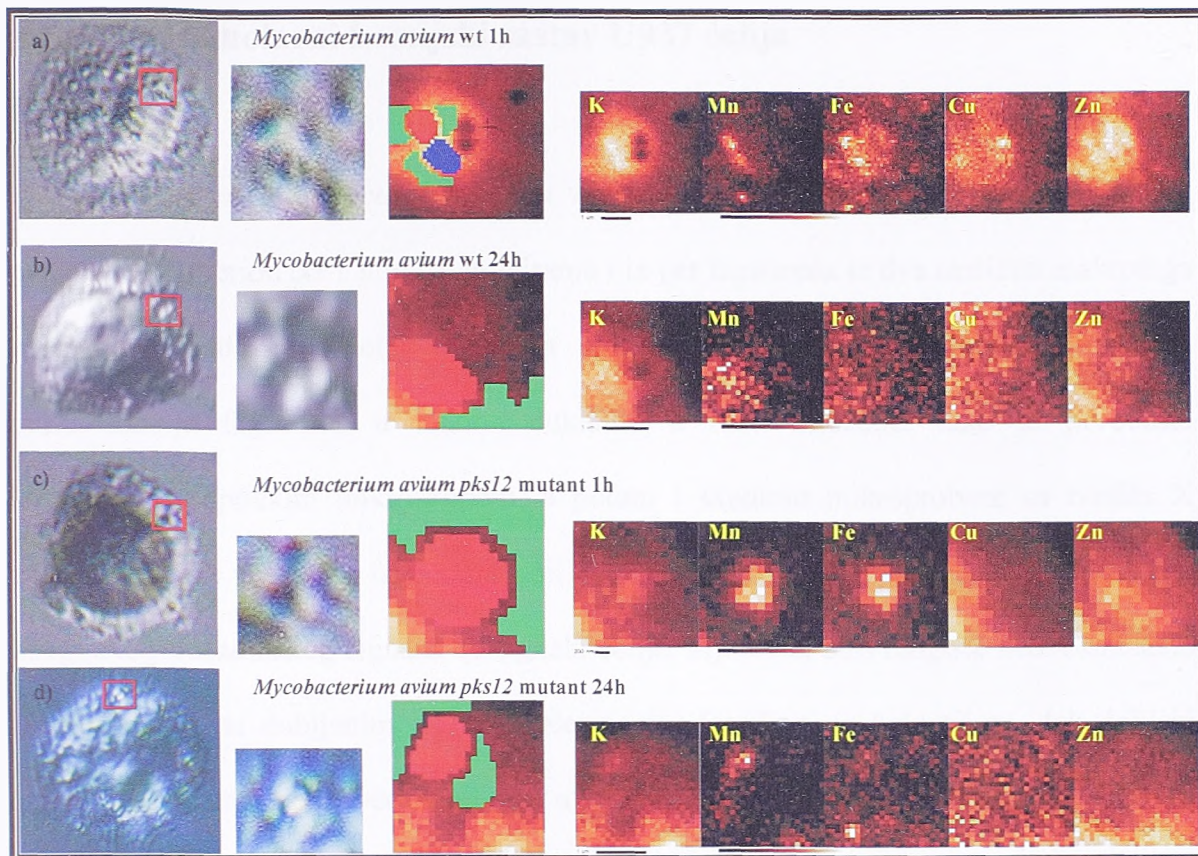
U ovom radu su po prvi put izmerene koncentracije hemijskih elemenata u fagozomima U937 ćelija inficiranih *M. avium* wt i njegovim *pks12* mutantom i definisane

specifične mikrosredine unutar endozom-lizozom sistema humanog domaćina, koristeći sve prednosti mikroprobe sa tvrdim X zracima, tehnike koja pruža novi pristup proučavanju unutarćelijskog života patogena.

Na Slici 11 su prikazani diferencijalno-interferentna kontrastna („differential interference contrast“) mikrografija inficiranog makrofaga (Slika 11a), distribucija kalijuma u makrofagu (Slika 11b) i distribucija elemenata i fluorescentni spektar detektovanih X zraka dva fagozoma koja sadrže mikobakterije (Slike 11c – 11e). Distribucija pet elemenata (kalijum, mangan, gvožđe, bakar i cink) i odgovarajuće mikrografije analiziranih fagozoma su prikazane na Slici 12.



Slika 11 – Mapa hemijskih elemenata *Mycobacterium avium* wt u fagozomu U937 ćelije – definisanje regiona od interesa (fagozomalnih i ćelijskih) i analiza rezultata. Incidentni snop X zraka energije od 10 keV pobuđuje elemente u analiziranom uzorku. Fluorescentni X zruci (fotoni) karakteristični za svaki element se emituju i detektuje ih energetska-disperzivni detektor. a) Optička diferencijalno-interferentno kontrastna mikrofografija U937 ćelije inficirane sa *M. avium* wt, 1 sat posle infekcije. Regioni makrofaga koji sadrže fagozome sa mikobakterijama i koji su skenirani, su obeleženi; b) Distribucija kalijuma u makrofagu (preliminarni sken makrofaga). Pozicije dva skenirana fagozoma koja sadrže bakterije su naznačene. Veličina skena je 20x20 µm; veličina koraka 0,5x0,5 µm. c) Sken dva blisko locirana fagozoma. Bakterije su obeležene crvenom i plavom bojom, dok je pozadinski signal, ćelijski signal, obeležen zelenom bojom. Veličina skena je 4x4 µm; veličina koraka 0,1x0,1 µm. d) Spektar X zraka dva mikobakterijska fagozoma i ćelijske pozadine. Bakterijski spektri su obeleženi crvenom odnosno plavom bojom, dok je zelenom bojom obeležen ćelijski fluorescentni spektar. e) Distribucija elemenata dobijena iz spektra X zraka.



Slika 12 – Distribucija kalijuma, mangana, gvožđa, bakra i cinka. Prikazani su primeri odabranih makrofaga inficiranih sa *Mycobacterium avium* wt (a i b) i *Mycobacterium avium pks12* mutantom (c i d), 1 h i 24 h. Optičkom mikroskopijom makrofazi sa intracelularnim bakterijama su identifikovani i fagozomi odabrani za analizu su skenirani. Rezolucija skeniranja (veličina koraka) je bila 0,1x0,1 μm. Skenirani regioni su oivičeni crvenim kvadratima na optičkim mikrografijama i posebno izdvojeni i prikazani. Definisanje regiona od interesa (bakterijskog – crvenog i pozadinskog – zelenog) na mapi distribucije kalijuma za svaki fagozom je takođe prikazano, kao i distribucija pet elemenata (kalijuma, mangana, gvožđa, bakra i cinka).

4.1. Intravakuolarni hemijski sastav U937 ćelija

Podaci za *Mycobacterium avium* wt su dobijeni iz 14 fagozoma iz tri različita makrofaga za period od 1 h posle inficiranja i iz pet fagozoma iz dva različita makrofaga za 24 h po infekciji. Uočljiva razlika u broju analiziranih fagozoma je posledica pozicioniranja fagozoma u blizinu nukleusa u toku infekcije. Iako je prvobitno identifikovan optičkim mikroskopom, a potom i skeniran mikroprobom sa tvrdim X zracima znatno veći broj fagozoma koji sadrže mikobakterije posle 24h od infekcije, zbog jakog pozadinskog signala, tj. signala ćelije, nije uvek bilo moguće nedvosmisleno identifikovati, na dobijenim mapama elemenata, fagozom sa bakterijom. Jak ćelijski signal je rezultat njene veće debljine u blizini nukleusa, a kako makrofag ima isti elementarni sastav (kvalitativno posmatrano) kao i bakterije, u tim slučajevima nije moguće uvek razdvojiti sa zadovoljavajućom preciznošću bakterijsku od eukaritske ćelije.

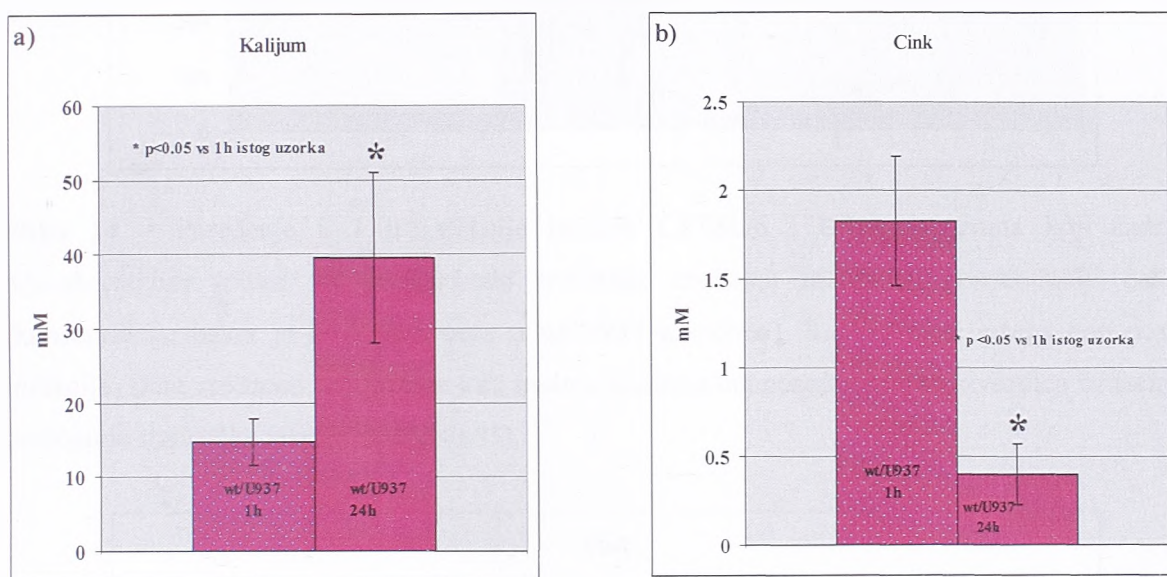
U Tabeli 1 su prikazane koncentracije elemenata, koji su detektovani u vakuolama koje sadrže *M. avium* wt, u različitim ćelijama domaćina – U937 ćelijama (ovaj rad) i peritonealnim makrofazima izolovanim iz C57BL/6 miša (Wagner *et al.*, 2005a).

Tabela 1 – Poređenje U937/wt i C57BL/6/wt uzoraka. Peritonealni makrofazi su izolovani iz C57BL/6 miševa i inificirani sa *Mycobacterium avium* wt kao što je prethodno opisano (Wagner *et al.*, 2005a). Koncentracije fosfora i nikla u C57BL/6/wt uzorcima su označene kao nedostupne (*n/a*), zbog nedostupnosti standarda za te elemente u trenutku kada su eksperimenti rađeni. Zapravo, vrednosti za ove elemente su izražene u radu Warner-a i ostalih (2005a) kao counts/s/A što je omogućilo njihovo međusobno poređenje, no ovde nisu prikazane, pošto ih nije moguće uporediti sa rezultatima dobijenim za U937/wt uzorke. Broj merenja (*n*) je prikazan u dnu tabele za svaki uzorak i isti je za sve elemente izuzev za fosfor, čiji je broj merenja prikazan u zagradi. Date vrednosti su izražene kao srednja vrednost±standardna greška. Koncentracije elemenata su izražene kao mM ili μM , uz pretpostavku da je prosečna debljina mikobakterija 1 μm .

Element (jedinice)	Wild-type/U937		Wild-type/C57BL/6	
	1 h	24 h	1 h	24 h
P (mM)	30,26±14,28	13,59±11,30	<i>n/a</i>	<i>n/a</i>
K (mM)	14,60±3,16 ⁺	39,48±11,46	36,76±15,73	5,53±2,88
Ca (mM)	11,97±2,66	4,45±4,45	4,14±1,55	2,50±1,07
Mn (μM)	68,95±38,51	83,31±26,58	11,83±4,44	24,23±5,77
Fe (μM)	181,58±45,89	109,08±80,34 ^{&}	299,10±61,50 [*]	1166,82±473,60
Ni (μM)	0,23±0,23 [§]	13,80±11,74	<i>n/a</i>	<i>n/a</i>
Cu (μM)	472,13±111,25 ^{§#}	84,72±30,45	28,84±11,36	17,56±10,25
Zn (mM)	1,83±0,36 ^{+#}	0,40±0,17	0,13±0,04	0,12±0,03
	<i>n</i> =14(13)	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 3
⁺ p<0,05 1 h vs. 24 h wt/U937 [*] p<0,05 1 h vs. 24 h wt/C57BL/6 [#] p<0,05 1 h vs. 1 h ^{&} p<0.05 24 h vs. 24 h [§] p=0.057 1 h vs. 24 h za Ni, odnosno p=0.058 za bakar				

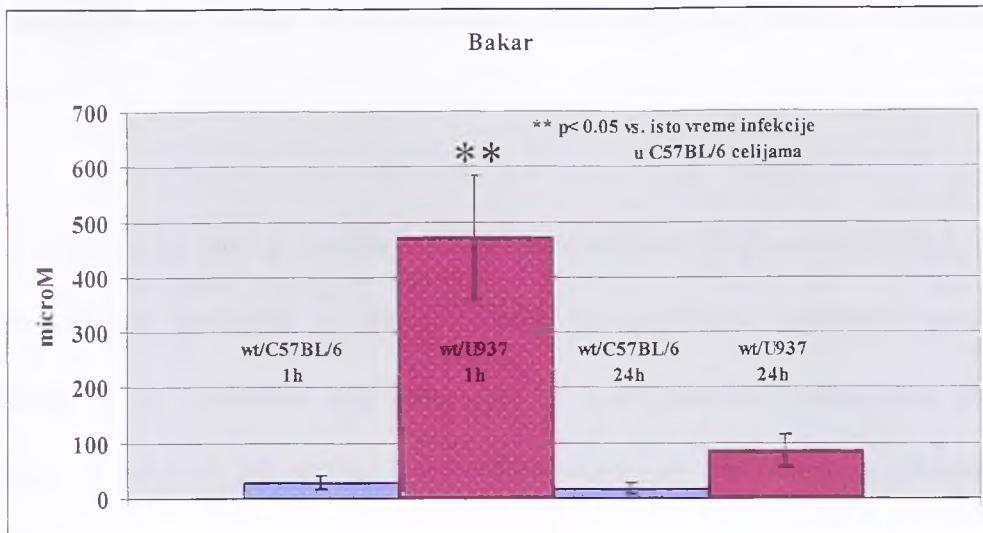
Uočljivo je da je koncentracija kalijuma značajno veća (2,7 puta), dok je koncentracija cinka niža (4,6 puta) u fagozomima U937 ćelija koje sadrže *M. avium* wt

24 h posle infekcije, u poređenju sa istim uzorkom u 1 h infekcije (Slika 13), dok promene u koncentraciji ovih elemenata nisu detektovane kod C57BL/6 fagozoma. Promene u koncentracijama nikla (porast od 60 puta) i bakra (opadanje od 5,6 puta) su bile skoro statistički značajne ($p=0,057$ za nikl i $p=0,058$ za bakar).

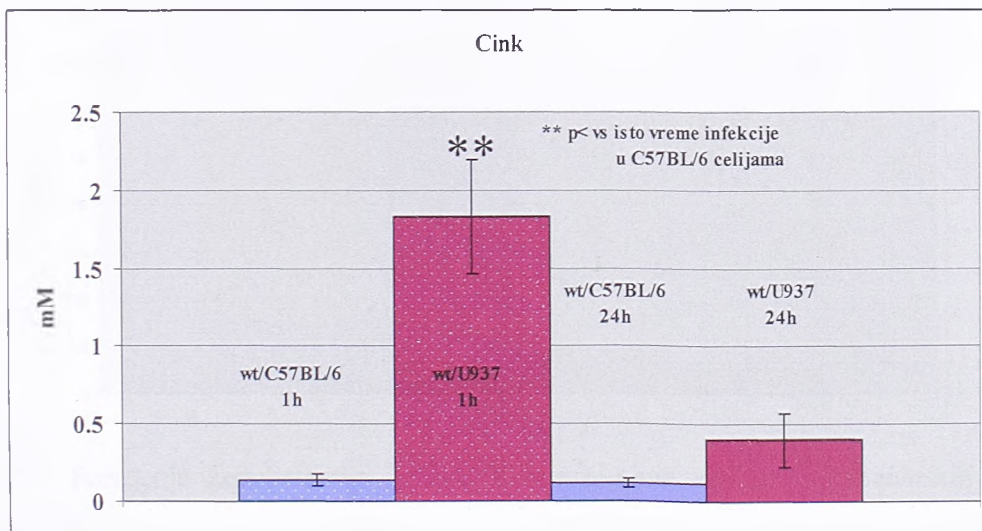


Slika 13 – a) Koncentracija kalijuma u fagozomu U937 ćelija koji sadrži *Mycobacterium avium* wt je značajno povećana – 2,7 puta – u toku infekcije, dok **b)** koncentracija cinka opada 4,6 puta posle jednog dana infekcije. Date vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm standardna greška; zvezdica označava postojanje statističke značajnosti ($p < 0,05$).

Poređenjem intravakuolarnog hemijskog sastava u 1 h infekcije, između fagozoma U937 ćelija i fagozoma peritonealnih mišijih makrofaga, utvrđena je statistički značajano veća koncentracija bakra (16,4 puta) i cinka (14 puta) u fagozomima ćelija humanog modela mikobakterijemije (Slike 14 i 15). Dvadeset i četiri sata posle, ove razlike nisu uočene (Slike 14 i 15).



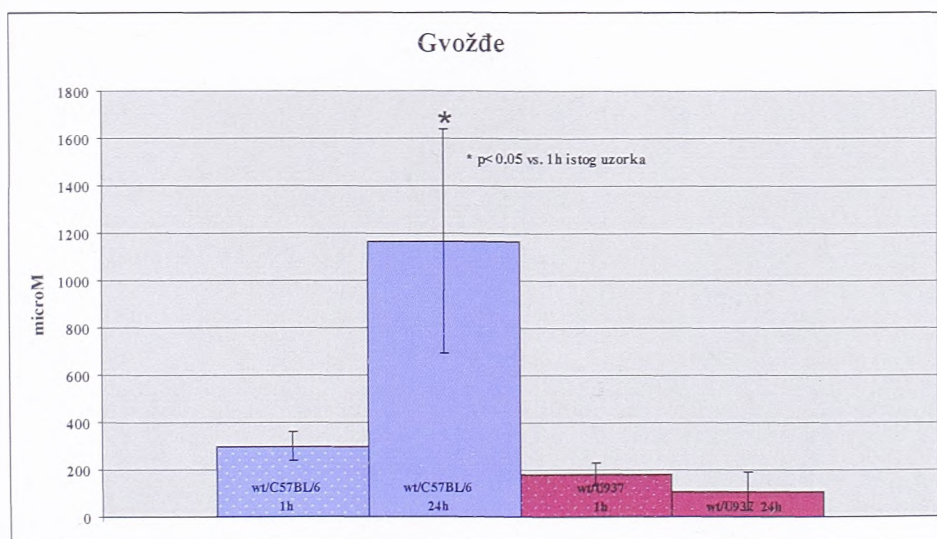
Slika 14 – Poređenje u 1 h infekcije između C57BL/6 i U937 fagozoma koji sadrže *Mycobacterium avium* wt je pokazalo statistički značajnu razliku u koncentraciji bakra (koncentracija bakra je 16,4 puta veća u wt/U937 uzorcima). Razlika nije uočena dan posle infekcije. Date vrednosti su izražene kao srednja vrednost±standardna greška; zvezdica označava postojanje statističke značajnosti (p<0,05).



Slika 15 – Izmerena koncentracija cinka je 14 puta veća u U937 fagozomima koji sadrže *Mycobacterium avium* wt u odnosu na C57BL/6 mišije peritonealne makrofage. Slično bakru, razlika nije uočljiva jedan dan posle. Date vrednosti su izražene kao srednja vrednost±standardna greška; zvezdica označava postojanje statističke značajnosti (p<0,05).

4.1.1. Koncentracija gvožđa u fagozomima U937 ćelija koji sadrže *Mycobacterium avium* wt

S obzirom na značaj gvožđa kako u baktericidnom dejstvu makrofaga, tako i u životnom ciklusu patogena posebna pažnja je posvećena praćenju promena u koncentraciji ovog elementa od koga zavise mnogobrojni metabolički procesi i prokariotskih i eukariotskih ćelija. Porast u koncentraciji gvožđa, nije primećena dan posle infekcije, iako je izmerena u fagozomima C57BL/6 peritonealnih makrofaga koji su sadržali *M. avium* wt (Slika 16).



Slika 16 – Poređenje koncentracije gvožđa u fagozomima različitih domaćinskih ćelija – C57BL/6 i U937 ćelija – koji su sadržali *M. avium* wt u prvom i 24-tom satu infekcije. Dok je očigledna statistički značajna razlika – povećanje koncentracije gvožđa od 3,9 puta u toku infekcija mišijih peritonealnih makrofaga detektovana u fagozomima koji su sadržali *M. avium* wt (Wagner *et al.*, 2005a), trend povećanja koncentracije ovog elementa u prva 24 h infekcije humanih U937 ćelija sa *M. avium* wt, iako očekivan, nije zabeležen. Date vrednosti su izražene kao srednja vrednost±standardna greška; zvezdica označava postojanje statističke značajnosti ($p<0,05$).

4.2. Hemijski sastav fagozoma koji sadrži *Mycobacterium avium pks12* mutant

U slučaju mutanta *Mycobacterium avium pks12*, 16 različitih fagozoma iz četiri različita makrofaga iz dve različite preparacije uzoraka je skenirano za prvi sat infekcije, dok je 12 različitih fagozoma, iz tri različita makrofaga iz dve različite preparacije skenirano za drugu vremensku tačku, za dvadeset i četvrti sat infekcije.

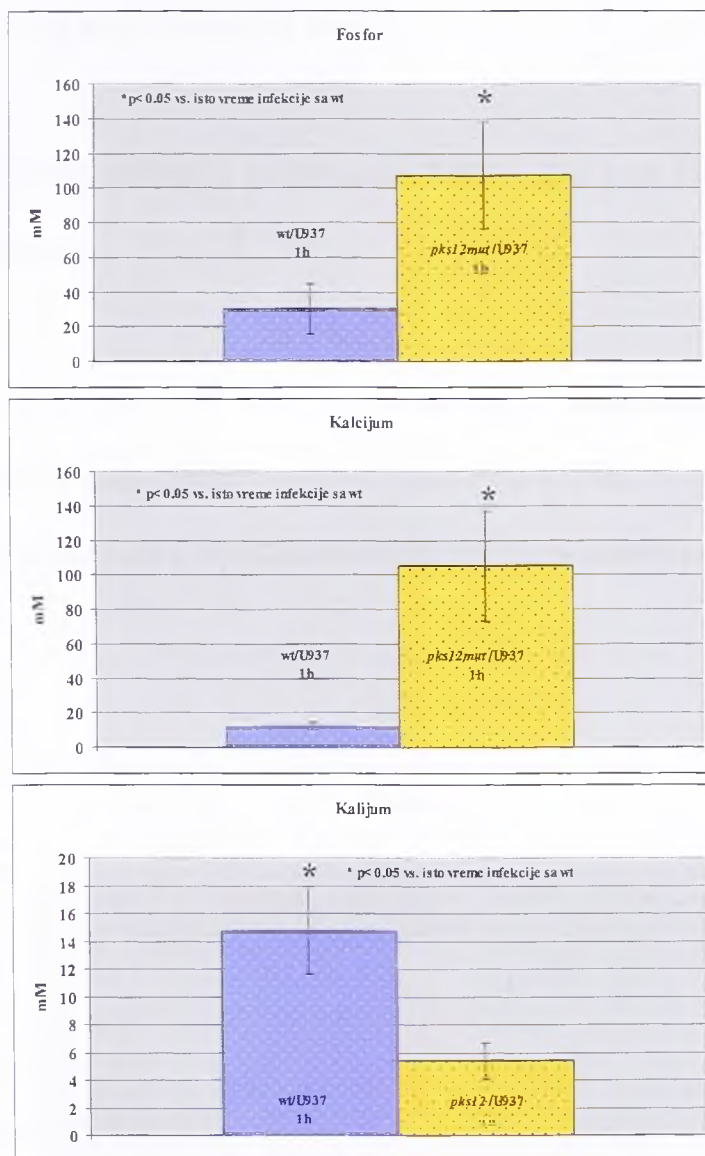
U Tabeli 2 su predstavljene koncentracije hemijskih elemenata izmerene u fagozomima U937 ćelija koji su sadržali bilo wt (prikazano i u Tabeli 1) bilo *pks12* mutant.

Table 2 - U937 ćelije su inficirane 1 h i 24 h sa *Mycobacterium avium* wt i *Mycobacterium avium pks12* mutantom. Podaci za različite elemente su istovremeno prikupljeni za svaki fagozom; stoga je broj merenja (*n*) isti za sve elemente, izuzev za fosfor, i prikazan je na dnu tabele. Broj merenja za fosfor je dat u zagradi. Date vrednosti su izražene kao srednja vrednost±standardna greška. Koncentracije elemenata su izražene kao mM ili µM, uz pretpostavku da je prosečna debljina mikobakterija 1µm.

Element (unit)	Wild-type		<i>pks12</i> mutant	
	1 h	24 h	1 h	24 h
P (mM)	30,26±14,28	13,59±11,30	106,88±30,76 ^{*#}	9,50±5,68
K (mM)	14,60±3,16 ⁺	39,48±11,46	5,37±1,29 ^{*#}	19,60±6,09
Ca (mM)	11,97±2,66	4,45±4,45	105,03±31,72 ^{*#}	5,78±1,66
Mn (µM)	68,95±38,51	83,31±26,58	102,90±37,18	35,80±10,20 ^{&}
Fe (µM)	181,58±45,89	109,08±80,34	192,43±46,85 [*]	47,26±10,39
Ni (µM)	0,23±0,23 [§]	13,80±11,74	0,46±0,35 [*]	4,64±1,54
Cu (µM)	472,13±111,25 [§]	84,72±30,45	994,67±264,97 [*]	38,56±9,46
Zn (mM)	1,83±0,36 ⁺	0,40±174,17	1,74±0,49	0,72±0,21
	<i>n</i> =14(13)	<i>n</i> = 5	<i>n</i> =16(10)	<i>n</i> = 11(10)
+ <i>p</i> <0,05 1 h vs. 24 h wt mutant * <i>p</i> <0,05 1 h vs. 24 h <i>pks12</i> mutant # <i>p</i> <0,05 1 h vs. 1 h & <i>p</i> <0,05 24 h vs. 24 h § <i>p</i> =0,057 za nikl, odnosno <i>p</i> =0,058 za baker 1 h vs. 24 h				

U prvom satu infekcije, koncentracije fosfora i kalcijuma su povećane u fagozomu koji sadrži *pks12* mutantu u poređenju sa wt (3,5 puta, odnosno 8,8 puta), dok je koncentracija kalijuma u prvom satu infekcije manja u mutantu – 2,7 puta (Slika 17). Posle 24 h infekcije statistički značajne razlike u koncentracijama fosfora, kalcijuma i kalijuma nisu detektovane, kada su poredene koncentracije tih elemenata između mutanta

i wt. Međutim, koncentracija mangana je značajno manja - 2,3 puta – u fagozomu koji sadrži *pks12* mutant, u ovoj vremenskoj tački infekcije, u odnosu na U937/wt uzorak.



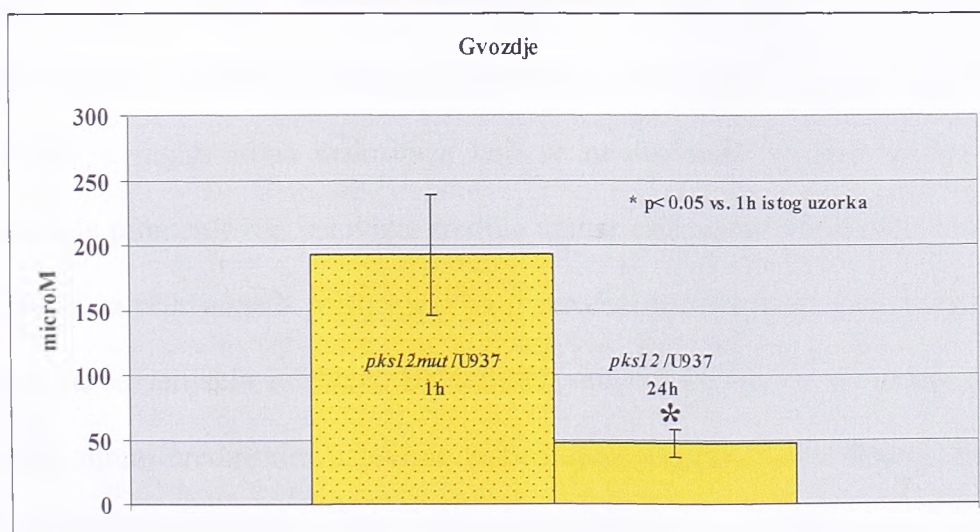
Slika 17 – Poređenje *pks12*/U937 sa wt/U937 uzorcima je pokazalo da su *pks12*/U937 uzorci imali veću koncentraciju fosfora i kalcijuma, ali nižu koncentraciju kalijuma, u prvom satu infekcije, u poređenju sa wt/U937 uzorcima. Date vrednosti su izražene kao srednja vrednost±standardna greška; zvezdica označava postojanje statističke značajnosti ($p < 0,05$).

Kada je upoređivan *pks12* mutant u toku infekcije (tj. prvi sat nasuprot dvadeset i četvrtom satu), detektovano je značajno povećanje koncentracije kalijuma od 3,6 puta.

Koncentracija nikla je takođe porasla (porast od 10 puta). Sa druge strane, isto poređenje u okviru ovog uzorka – u toku infekcije - je pokazalo opadanje koncentracije fosfora (11 puta), kalcijuma (18 puta) i bakra (26 puta).

4.2.1. Koncentracija gvožđa u fagozomima U937 ćelija koje sadrže *Mycobacterium avium pks12* mutant

U toku infekcije U937 ćelija *M. avium pks12* mutantom, dolazi do statistički značajnog opadanja koncentracije gvožđa, što se moglo očekivati obzirom na atenuiranu prirodu ovog mutanta (Slika 18). Koncentracija gvožđa se smanjuje četiri puta posle 24 h infekcije.



Slika 18 - Poređenje koncentracije gvožđa u fagozomima U937 ćelija koje sadrže *pks12* mutant. Date vrednosti su izražene kao srednja vrednost±standardna greška; zvezdica označava postojanje statističke značajnosti ($p<0,05$).

V Diskusija

Mycobacterium avium je važan humani intracelularni patogen, koji prvenstveno inficira mononuklearne fagocite. Ova mikobakterija preživljava i replicira se unutar fagozoma, u sredini koja se smatra siromašnom nutrijentima, u kojoj su neophodni hranljivi sastojci uskraćeni fagocitiranim mikroorganizmima. Pored toga što makrofagne vakuole smanjuju dostupnost nutrijenata bakterijama kako bi im izgladnjivanjem onemogućile preživljavanje unutar fagozoma, makrofazi smanjuju bakterijsko preživljavanje i regulacijom koncentracije elemenata unutar fagozoma (Wagner *et al.*, 2005b). Smatra se da dostupnost gvožđa u fagozomu, omogućena transferinskim receptorima, dovodi putem Fentonove reakcije (Slika 19) u kojoj se stvaraju toksični kiseonični slobodni radikali, do oštećenja bakterijske DNK. Preživljavanje i umnožavanje ove bakterije u fagozomima makrofaga koji se ne fuzionišu sa lizozomima i njeno prilagođavanje promenljivim uslovima sredine unutar endozomalnog sistema u potpunosti je suprotnosti sa prihvaćenim mišljenjem da makrofazi predstavljaju prvu liniju odbrane organizma od bakterijskih infekcija. Bakterijski patogeni kao što je *M. avium* opstaju u ovim nepovoljnim sredinskim uslovima zahvaljujući eksprimiranju faktora virulencije koji im omogućavaju preživljavanje i replikaciju (Wagner *et al.*, 2005a).

S obzirom da su elementi u tragovima često kofaktori enzima, regulacija koncentracije elemenata u tragovima u fagozomima koji sadrže mikobakterije, naročito gvožđa od koga zavise brojni procesi u bakteriji (između ostalih i replikacija i ćelijsko

disanje) je od krucijalnog značaja za preživljavanje ovih intracelularnih organizama (De Voss *et al.*, 2000).



Slika 19. Gvožđe je esencijalni nutrijent za gotovo sve životne forme. Javlja se u dva stabilna oksidativna stanja - Fe^{2+} i Fe^{3+} - lako prelazeći iz jednog u drugo, što mu omogućava da učestvuje u redoks reakcijama. U prisustvu kiseonika gvožđe može da postane toksično jer katalizuje reakciju u kojoj se formiraju slobodni kiseonični radikali. Gvožđe u svojoj redukovanoj formi u Fentonovoj reakciji prevodi manje reaktivan vodonik peroksid u reaktivnije kiseonično jedinjenje – hidroksilni radikal (OH^\bullet) (Touati, 2000).

Pored kofaktorske uloge neorganskih jona, njihova koncentracija unutar fagozoma čini jedan od brojnih sredinskih faktora (kao što su i temperatura, pH, osmomolarnost itd.) koji mogu da utiču na ekspresiju bakterijskih gena (Wagner *et al.* 2005a). Poznato je da je nekoliko faktora virulencije kao što su šiga (shiga) toksin iz *Shigella* sp. i difterija toksin iz *Corynebacterium* sp. regulisano koncentracijom gvožđa (Litwin & Calderwood, 1993; Miller *et al.*, 1989). Yop sistem *Yersinia* sp. koji je povezan sa inhibicijom fagocitoze, je regulisan niskom koncentracijom kalcijuma (Cornelis *et al.*, 1998), dok je PhoP/PhoQ, dvokomponentni regulatorni sistem *Salmonella* sp. koji je neophodan za njeno intracelularno preživljavanje, regulisan niskom koncentracijom magnezijuma u fagozomu koji sadrži ovu bakteriju (Litwin & Calderwood, 1993; Vescovi *et al.*, 1996). Uprkos sve većem broju studija koje ukazuju da brojni patogeni mikroorganizmi kao što su *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio* (Finlay & Falkow, 1997), kao i *M. avium* zavise od sredinskih faktora, uključujući i koncentraciju neorganskih jona u spoljašnjoj sredini, a koji regulišu ekspresiju gena za virulenciju i fenotip, veoma malo informacija postoji o koncentraciji ovih elemenata u

intracelularnim odeljcima u kojima se ovi patogeni mogu naći. Tačnije, uprkos očiglednom značaju elemenata u tragovima (bilo sa aspekta kofaktorske funkcije, bilo sa aspekta regulatora ekspresije gena za virulenciju) u procesu infekcije, direktna merenja njihovih koncentracija nisu urađena (Wagner *et al.*, 2005a). Još manje se zna o koncentraciji i regulaciji drugih neorganskih jona u fagozomima koji sadrže intracelularne bakterije, iako su oni od velike važnosti za mnoge ćelijske funkcije (Wagner *et al.*, 2005a).

Nedavno je objavljeno da su upotrebom mikroprobe sa tvrdim X zracima analizirane koncentracije elemenata unutar fagozoma C57BL/6 mišijih peritonealnih makrofaga inficiranih *M. tuberculosis* i *M. avium* ili nepatogenim *Mycobacterium smegmatis* (Wagner *et al.*, 2005a). Iako je još od XIX veka poznato da je suplementacija gvožđa (dodatak gvožđa ishrani) faktor rizika za razvoj tuberkuloze, do skora nije bilo jasno da li je njegova koncentracija u fagozomu makrofaga koji sadrži mikobakterije limitirana, kao što je to slučaj u vakuolama epitelnih ćelija koje sadrže *Salmonella* bakterije. Istraživači su uglavnom smatrali, na osnovu velikog broja eksprimiranih mikobakterijskih gvožđe-vezujućih domena, da je koncentracija gvožđa u fagozomima koji sadrže mikobakterije ograničena. Međutim, pokazana dostupnost transferina fagozomima koji sadrže mikobakterije dovela je u pitanje ovu interpretaciju (Wagner *et al.*, 2005a). Ova istraživanja su pokazala da samo patogene mikobakterije (ali ne i nepatogena *M. smegmatis*) akumuliraju gvožđe u fagozomima, ističući značaj njegove koncentracije za intracelularno preživljavanje patogenih mikobakterija (Wagner *et al.*, 2005a). Takođe je pokazano postojanje značajnih razlika u koncentracijama drugih elemenata u fagozomima, kao što su hlor, nikel i cink, poređenjem patogenih bakterija *M.*

avium i *M. tuberculosis* nakon prvog sata infekcije. Razlike u koncentraciji elemenata u fagozomima postoje i između patogenih mikobakterija i nepatogene *M. smegmatis*. Svi ovi rezultati ukazuju na postojanje mikrosredine specifične za patogene unutar endozomalnog sistema ćelije domaćina (Wagner *et al.*, 2005a).

Potencijalni kandidati za sakupljanje/uklanjanje gvožđa i/ili drugih dvovalentnih katjona iz endozomalnog sistema (u ćelijsku citoplazmu) su članovi proteinske familije dvovalentnih katjonskih transportera, Nramp1 i Nramp2 (natural-resistance-associated macrophage protein 1, odnosno 2), koji su eksprimirani u različitim fazama u endozomalnom sistemu. Za razliku od Nramp1 proteina koji je specifičan za makrofage i monocite, Nramp2 je eksprimiran u različitim ćelijama, uključujući i makrofage gde je detektovan prvenstveno u recikliranim endozomima, kao i na, doduše u manjem stepenu, plazma membrani. Pretpostavlja se da Nramp1, takođe poznat i kao Slc11a1 (solute carrier family 11 member; nova klasifikacija) reguliše intrafagozomalnu replikaciju različitih nesrodnih patogena (mikobakterija, *Salmonella* i *Leishmania*) kontrolišući koncentraciju dvovalentnih katjona (Govani & Gros, 1998). Polimorfizam u i oko *Nramp1* lokusa je genetički povezan sa prijemčivošću na infekciju *M. tuberculosis* i *M. leprae* i razvoj tuberkuloze (Awomoyi *et al.*, 2002; Bellamy *et al.*, 1998), odnosno lepre (Abel *et al.*, 1998) kod ljudi. Nramp1, lokalizovan na membranama kasnih endozoma/lizozoma je transporter dvovalentnih katjona (Barton *et al.*, 1999), ali da li funkcioniše kao efluks ili inluks pumpa predmet je rasprave koja još uvek traje (Forbes & Gros, 2001; Gomes & Appelberg, 2002; Kuhn *et al.*, 2001). Iako je ko-lokalizacija Nramp1 proteina sa fagozomima koji sadrže mikobakterije pokazana samo na nekim fagozomima koji su sadržali *M. avium* (Searle *et al.*, 1998), dokazano je da Nramp1 utiče

na intracelularno preživljavanje *M. avium* u mišijim makrofazima dobijenim iz kostne srži (Frehel *et al.*, 2002). U ovoj studiji korišćene su U937 ćelije koje su Nramp1^{-/-}, (baš kao i C57BL/6 mišiji peritonealni makrofazi, korišćeni u ranijim eksperimentima) tako da mogući uticaj funkcionalnog Nramp1 proteina na koncentraciju elemenata u fagozomima koji sadrže mikobakterije nije ispitan.

S obzirom na značaj koncentracije neorganskih jona u intracelularnim infekcijama, značaj mikobakterijskih infekcija za humanu populaciju i činjenicu da je jako malo direktnih merenja koncentracija neorganskih jona do sada urađeno, u ovoj studiji proučavane su koncentracije elemenata u fagozomima U937 ćelija koji sadrže *M. avium* koristeći istu tehniku - mikroprobu sa tvrdim X zracima. U937 ćelije se koriste kao model za humanu bakterijemiju, jer pokazuju veliku sličnost sa makrofazima periferne krvi/ jetre. Pored definisanja specifične sredine za ovaj patogen u humanom domaćinu, cilj je bio da se dobijeni rezultati uporede sa već postojećim vrednostima dobijenim za fagozome mišijih peritonealnih makrofaga da bi se utvrdile eventualne razlike između ćelija različitih domaćina.

Osetljivost mikroprobe sa tvrdim X zracima omogućava detektovanje veoma malih količina elemenata, reda 10^{-16} g, na primer cinka, unutar ćelije, pri energiji incidentnih X zraka od 10 keV. Međutim, trenutno dostupna optička oprema koja se koristi u mikroskopiji X zracima (100 nm) ne obezbeđuje dovoljnu prostornu rezoluciju, neophodu da bi se razlikovala vakuola tj., intrafagozomalni prostor od bakterije. Kako je vakuolarna membrana veoma blisko pozicionirana u odnosu na najudaljenije strukture ćelijskog omotača mikobakterija, intrafagozomalni prostor je zamenarljivih dimenzija, te

je pretpostavljeno da je većina elemenata koji su detektovani zapravo lokalizovana unutar same bakterije.

Pošto su mrežice za elektronsku mikroskopiju koje su korišćene napravljene od zlata, a sadrže i primese bakra i imajući u vidu osetljivost mikroprobe sa tvrdim X zracima, neophodno je voditi računa o tome da odabrani makrofag i/ili njegovi fagozomi ne budu preblizu ivicama mrežice tj. „prečkama“. Razlog za to je pobuđivanje zlata i bakra iz mrežice i emisija fluorescentnih X zraka karakterističnih za ova dva elementa. Iako je korišćena energija incidentnih X zraka (10 keV) nedovoljna za pobuđivanje najintenzivnijih X zraka fluorescentnog spektra zlata, sasvim je dovoljna da dovede do emisije M serije fluorescentnih X zraka karakterističnih za zlato, čija se energija nalazi između energije K_{α} fluorescentnih signala fosfora i sumpora, čime su ova dva signala maskirana ($K_{\alpha 1}$ za fosfor iznosi 2,0137 keV, za sumpor 2,30784 keV, dok je energija $M_{\alpha 1}$ fluorescentne linje zlata 2,1229 keV; Grupa autora, 2001). Sa druge strane, emisija karakteristične spektralne energije bakra iz mrežice je identična onoj koju emituje bakar iz uzorka. Ono što zapravo može da utiče na kvantifikaciju bakra u uzorku u ovom slučaju je činjenica da mrežica sama po sebi sadrži mnogo više bakra te njegov signal pre pokriva signal bakra iz uzorka. Čak i kada postoji mogućnost da se na osnovu distribucije drugih elemenata i poređenjem sa optičkom mikrografijom definišu region fagozoma sa bakterijom i pozadinski, tj. ćelijski region, vrednosti za bakar se ne uzimaju u obzir, jer predstavljaju zbir stvarne koncentracije bakra u uzorku i bakra iz mrežice. Problem može da stvori i gas argon, zastupljen u atmosferi sa 0,9 %. Mada bi problem trebao da bude eliminisan zamenom atmosfere (u komori sa uzorkom) helijumom, do ometanja signala kalijuma može da dođe usled nepotpune zamene. Pregledanjem svakog

pojedinačnog fluorescentnog spektra X zraka analiziranih fagozoma (zapravo, oba definisana regiona – i fagozomalnog i ćelijskog) proverava se verodostojnost dobijene kvantifikacije za svaki element. Posebna pažnja se poklanja ovim, potencijalno „ugroženim“ hemijskim elementima, i svaka vrednost koja je kompromitovana biva eliminisana iz dalje analize. Praktično, svaki fluorescentni signal može biti ugrožen signalom elementa u neposrednoj blizini. Iako priprema uzorka, uključujući pripremu rastvora sa kojima se radi, posebno fiksativa koji se koristi da se prirodno stanje „zamrzne“ i hemijski elementi zadrže na mestu na kom su se zatekli odražavajući tako svoju nativnu distribuciju i koncentraciju, kao i veoma osetljiva faza ispiranja uzoraka u HBSS-u i sterilnoj vodi, ne bi trebalo da utiču na distribuciju i koncentraciju lako pokretljivih jona, svi ovi koraci mogu biti pod znakom pitanja. Poznato je da koncentracija hlora može da poraste u fiksiranim uzorcima ukoliko su oni čuvani na atmosferskom pritisku čak i relativno kratko vreme (lična komunikacija, Wagner D.), te se mora obratiti pažnja i na dobijene vrednosti ovog elementa. Pored toga treba voditi računa da jak signal hlora može da pokrije signal sumpora, pa čak i fosfora (u periodnom sistemu elemenata redosled je - fosfor, sumpor, hlor, kalijum itd.; Slika 8, Uvod). Dobijene vrednosti za hlor za uzorke iz ovog rada su bile i po nekoliko desetina puta veće od do sada publikovanih (dobijene istom ili nekom drugom metodom) te nisu uzimane u obzir u analizi. Shodno tome iz analize su eliminisane i vrednosti za sumpor, jer je fluorescentni X zrak hlora maskirao stvarni signal sumpora. Verodostojnost dobijenih kvantitativnih vrednosti za druge elemente, pre svega one lako pokretne (kao što je na primer kalijum) je proveravana i poređenjem sa objavljenim vrednostima.

Imajući na umu ulogu gvožđa u bakterijskom rastu i intracelularnom preživljavanju, posebna pažnja je posvećena određivanju koncentracije gvožđa unutar makrofagnih fagozoma. Jedna od prednosti korišćene tehnike jeste mogućnost istovremenog detektovanja svih oksidativnih stanja elemenata. Gvožđe se nalazi u dva stabilna oksidativna stanja u ćelijama, Fe^{2+} i Fe^{3+} , i korišćenjem mikroprobe sa tvrdim X zracima detektuje se ukupna koncentracija gvožđa unutar analiziranog dela ćelije. Ovo, naravno važi za sve elemente. Kao što je već rečeno, u najnovijoj literaturi je pokazano da virulente bakterije (*M. avium* i *M. tuberculosis*) u toku infekcije akumuliraju gvožđe u fagozomima mišijih peritonealnih makrofaga u kojima su se našle i da je produkcija siderofora (jedinjenja sa visokim afinitetom za vezivanje gvožđa) neophodna da bi se gvožđe zadržalo (Wagner *et al.*, 2005a). Iako je akumulacija gvožđa u toku infekcije očekivana i kod fagozoma U937 ćelija koji su sadržali *M. avium* wt, nije zabeležena. Poređenjem U937 uzoraka sa C57BL/6 inficiranih *M. avium* wt sojem, vidimo da, iako nema statistički značajne razlike u prvoj vremenskoj tački infekcije, kada se ova dva uzorka porede (izmerene vrednosti su - $181,58 \pm 45,89 \mu\text{M}$ u U937, odnosno $299,10 \pm 61,50 \mu\text{M}$ u C57BL/6 fagozomima; $p > 0,05$), razlika se uočava u drugoj vremenskoj tački – 24 časa posle infekcije kada postoji statistički značajna razlika između ova dva uzorka. Koncentracija gvožđa u C57BL/6 fagozomu koji sadrži *M. avium* wt je skoro 11 puta veća nego u fagozomima U937 ćelija ($109,08 \pm 80,34 \mu\text{M}$ u U937 fagozomima, odnosno $1166,82 \pm 473,60 \mu\text{M}$ u C57BL/6 fagozomima; $p < 0,05$). Kod U937 ćelija inficiranih *M. avium* wt, koncentracija gvožđa se u toku prva 24 sata infekcije ne menja – nema statistički značajne razlike između prve i druge merene vremenske tačke ($181,58 \pm 45,89 \mu\text{M}$ u prvom satu nasuprot $109,08 \pm 80,34 \mu\text{M}$ 24 sata posle; $p > 0,05$).

M. avium wt ne akumulira gvožđe u fagozomima ovih ćelija, ali ga i ne gubi. Merenja su vršena u ove dve vremenske tačke, 1 i 24 sata posle infekcije, pošto su u prethodnim eksperimentima u tim vremenskim periodima detektovane promene u koncentraciji gvožđa i drugih, kako elemenata u tragovima tako i ostalih elemenata od biološkog značaja (Wagner *et al.*, 2005a). Zašto se u ovim ćelijama ne uočava povećanje koncentracije gvožđa nije u potpunosti jasno. Jedno od objašnjenja bi moglo da bude da su 24 sata od infekcije nedovoljno dug vremenski period da bi se u U937 ćelijama primetila akumulacija gvožđa. Preliminarni RT-PCR rezultati pokazuju da su gvožđe zavisni geni mikobakterija različito regulisani kod *M. tuberculosis* i *M. avium* u U937 ćelijama. Povećana ekspresija gena odgovornih za produkciju siderofora je detektovana 2 sata ranije kod *M. tuberculosis* u odnosu na *M. avium* (lična komunikacija, Wagner D.). Moguće je da je neophodno *M. avium* wt/U937 uzorke pratiti u toku dužeg vremenskog perioda da bi se detektovalo povećanje koncentracije gvožđa, tj. njegova akumulacija unutar fagozoma koji sadrže *M. avium* wt.

S druge strane, u fagozomima U937 ćelija koje su sadržale *M. avium* uočili smo značajno povećanje koncentracije kalijuma od 2,7 puta u toku infekcije, ($14,6 \pm 3,16$ mM u prvom satu posle infekcije nasuprot $39,48 \pm 11,46$ mM nakon 24 sata; $p < 0,05$) što nije zabeleženo u prethodnim eksperimentima sa fagozomima mišijih peritonealnih makrofaga koji su sadržali *M. avium* wt. Prethodno izmerene koncentracije kalijuma u ekstracelularnim mikobakterijama (30-50 mM), patogenim – *M. tuberculosis* i *M. avium* i nepatogenoj – *M. smegmatis*, su istog reda veličine kao i koncentracije kalijuma u bakterijama unutar fagozoma (Wagner *et al.*, 2005a). Vrednosti za kalijum u mikobakterijama (kako ekstracelularnim, tako i u mikobakterijama u fagozomima) se

kreću u opsegu koncentracija kalijuma objavljenih za druge bakterije (mereno za ekstracelularne bakterije), dobijene drugim metodama, prvenstveno TEM (transmisioni elektronski mikroskop) mikroanalizom X zraka – „TEM X ray microanalysis“ i elektronskom mikroprobnom analizom – „electron probe microanalysis“ (80-320 mM za „freeze-dried“ *E.coli* (Chang *et al.*, 1986); 100 mM za „air dried“ *E. coli* (Outten & O'Halloran, 2001), 45-130 mM za „air dried“ cijanobakterije (Heldal *et al.*, 2003)). Očigledno je da se koncentracije kalijuma u ekstracelularnim mikobakterijama izmerene mikroprobnom sa tvrdim X zracima dobro slažu sa do sada publikovanim podacima, koji su dobijeni drugim metodama. Koristeći „electron probe X ray analysis“ Reeves *et al.* (2002) su merili koncentraciju kalijuma u vakuolama neutrofila koji su fagocitirali *Staphylococcus aureus* (Reeves *et al.*, 2002). Dobijena srednja vrednost za kalijum u fagozomima neutrofila koji su sadržali *S. aureus* iznosi 130 mM. Iako je izmerena vrednost koncentracije kalijuma nešto veća od koncentracija kalijuma dobijenih za fagozome u kojima su se našle mikobakterije i dalje se ove vrednosti mogu smatrati sličnim. Identifikacija kalcijumom aktiviranog kalijumovog kanala velike provodljivosti na fagozomu neutrofilnih granulocita i neophodnost njegovog prisustva (Ahluwalia *et al.*, 2004; Reeves *et al.*, 2002) za baktericidno dejstvo neutrofila, dovodi u pitanje prihvaćeno mišljenje da se patogeni u neutrofilima eliminišu direktnim „ubijanjem“ slobodnim kiseoničnim radikalima. Kalijumski kanali do danas nisu locirani u fagozomima makrofaga. Međutim, s obzirom na dobijene rezultate, u najmanju ruku smo u iskušenju da spekuliramo da kalijumski kanali mogu modifikovati koncentraciju kalijuma u fagozomima makrofaga, utičući na preživljavanje intracelularnih patogena.

Koncentracija fosfora se nije menjala u toku infekcije u fagozomima U937 ćelija koje su sadržale *M. avium* wt, baš kao ni unutar C57BL/6/wt uzoraka. Međutim, eventualne razlike između ova dva domaćina nije bilo moguće ustanoviti pošto u eksperimentima sa mišijim makrofazima standard za fosfor nije bio dostupan (isti problem postoji i za nikl), te su za ove elemente vrednosti bile izražene u vidu counts/s/A što je dovoljno za poređenje unutar iste grupe uzoraka (1 h prema 24 h), ali ne i za poređenje sa U937/wt uzorcima (standardi za fosfor i nikl su bili dostupni za ove eksperimente). Promene u koncentraciji kalcijuma i nikla (koncentracija kalcijuma opada 2,7 puta, dok se koncentracija nikla povećava skoro 60 puta) nisu dostigle statističku značajnost (mada za nikl p vrednost iznosi 0,057). Koncentracija bakra i cinka opada u toku infekcije U937 ćelija 5,6, odnosno 4,6 puta. Promene u koncentraciji ovih dvovalentnih katjona nisu detektovane kod mišijih makrofaga. U prvom satu infekcije koncentracija cinka je u U937/wt fagozomima četrnaest puta veća ($1,83 \pm 0,36$ mM nasuprot $0,13 \pm 0,04$ mM; $p < 0,05$) u odnosu na C57BL/6/wt fagozome, ali razlika u 24 satu infekcije u koncentraciji cinka nije dostigla statističku značajnost. Iako postoje razlike u koncentraciji bakra kada se uporede prvi časovi infekcije sa *M. avium* wt (čak je 16,4 puta veća koncentracija kod U937/wt uzoraka u odnosu na C57BL/6/wt uzorak), statistička značajnost pada koncentracije bakra nije dostignuta u toku infekcije U937 ćelija *M. avium* wt ($472,13 \pm 111,25$ μ M u prvom satu infekcije nasuprot $84,72 \pm 30,45$ μ M 24 sata kasnije) iako je vrlo bliska statistički značajnoj vrednosti i iznosi 0,058.

Ovi rezultati ne samo da definišu i potvrđuju postojanje mikrosredine specifične za patogene organizme, već ukazuju i na to da je ona zavisna i od domaćina, u pogledu hemijskog sastava mikrosredine. Osim toga, ukazuju i na postojanje razlika u dinamici

procesa regulacije koncentracije neorganskih jona, opet u zavisnosti od domaćina. Očigledno je da je fluorescentna rentgenska mikroskopija jedinstvena tehnika koja omogućava istovremenu kvantifikaciju velikog broja elemenata (kvantitavna prednost) u tragovima, kao i drugih neorganskih jona. Iako za sada nismo u mogućnosti da sve izmerene koncentracije i promene koncentracija unutar fagozoma U937 ćelija koje su sadržale virulentni *M. avium* objasnimo, verujemo da iznošenje sveobuhvatnih kvantifikovanih podataka predstavlja značajan dodatak sadašnjem znanju o mikobakterijama i da svakako pruža osnovu za dalja istraživanja.

Kada je reč o virulentnosti patogenih bakterija, treba imati na umu da je to kompleksan, multifaktorski proces koji zahteva koordinisanu aktivnost velikog broja produkata bakterijskih gena (Chiang *et al.*, 1999). Infekcija se može generalno opisati kao niz događaja koji počinju kontaktom patogena sa domaćinom i njegovom kolonizacijom i koji su praćeni, u slučaju nekih patogenih bakterija, invazijom tkiva domaćina ili njegovih ćelija (Chiang *et al.*, 1999). Ove jedinstvene biološke aktivnosti su često povezane sa patološkim lezijama unutar domaćina koje mogu rezultovati manifestacijom jasnih simptoma i razvojem bolesti. Ipak, primarni zadatak patogena je da preživi i da se reprodukuje – nastanak i održavanje bolesti je prosto biološki odraz njegovog prisustva u pokušaju da ostvari svoj cilj koristeći sve raspoložive strategije (Mahan *et al.*, 2000). Patogenost mikroorganizama se može definisati kao sposobnost povećanja preživljavanja *in vivo*, gde je virulentnost u stvari stepen do kog patogeni realizuju ovu sposobnost *in vivo*. Prema tome, bilo koja funkcija koja doprinosi

preživljavanju mikroorganizama u domaćinu može se posmatrati kao determinanta virulentnosti, a odgovarajuća DNK sekvenca kao gen za virulenciju (Mahan *et al.*, 2000).

Već dugo se smatra da je mikobakterijski omotač uključen u patogenost ovih bakterija kao i u njihovu rezistenciju na nepovoljne sredinske uslove i antibiotike (Camacho *et al.*, 2001). Mikobakterijski omotač je jedinstven kako po svom molekulskom sastavu, tako i po građi. Čine ga neuobičajeni lipidi, kojima obiluje - oko 60 % mikobakterijskog omotača su lipidi, što ga čini izuzetno hidrofobnim (Kolattukudy *et al.*, 1997). Veliki broj radova opisuju efekte mikobakterijskih lipida na ćelije domaćina, sugerišući da su lipidi primarni kandidati za modulatore ćelijskog odgovora. Hidrofobna priroda mikobakterijskog ćelijskog zida omogućava pozicioniranje bakterije u neposrednoj blizini fagozomalne membrane (Rhoades and Ullrich, 2000). Lipidi spoljašnjeg dela ćelijskog zida su mikobakterijske komponente koje prve interaguju sa ćelijom domaćinom utičući na vezivanje za makrofagne receptore (Strokes & Speert, 1995; Venisse *et al.*, 1995; Hoppe *et al.*, 1997) i verovatno usmeravaju rane procese u modulaciji maturacije fagozoma (Goren *et al.*, 1976). Mikobakterijski lipidi utiču takođe i na inflamatorni odgovor. Makrofazi, da bi se odbranili, proizvode niz proinflamatornih citokina koji aktiviraju makrofagnu baktericidnu aktivnost (Basu, 2004). Sa druge strane, bakterija utiče na aktivaciju procesa koji ometaju makrofagnu baktericidnu aktivnost kao i na stvaranje sredine koja bi favorizovala njeno preživljavanje (Basu, 2004). Modulacija imunskog odgovara posredovanog ćelijama je izgleda jedan od faktora neophodnih za ustanovljavanje mikobakterijske infekcije unutar makrofaga (Paul & Beveridge, 1994). Jasno je dakle da preživljavanje mikobakterija unutar makrofaga zavisi od njihove sposobnosti da odgovore i da modifikuju sredinu u kojoj su se našle (Ainsa *et al.*, 2001),

a lipidi su primarni kandidati za modulatore. Međutim, većina postojećih literaturnih podataka opisuje efekte mikobakterijskih lipida na ćelije domaćina na osnovu eksperimenata u kojima su u suspenzije ćelijskih kultura dodavane frakcije izolovanih lipida što nužno ne odražava prirodno stanje u smislu dostupnosti lipida, niti kombinaciju lipida koji se javljaju u bakterijskoj infekciji (Rhoades *et al.*, 2003).

Očigledno je da *in vitro* eseji ne mnogu dovoljno precizno da reprodukuju sve aspekte interakcija koje postoje između domaćina i patogena. Treba imati u vidu da se u toku infekcije patogeni mogu naći u nekoliko veoma različitih sredina u domaćinu, i prema tome njihovi zahtevi mogu biti drugačiji u različitim fazama infekcije (posebno u kontekstu razvoja imunskog odgovora domaćina). Posledica toga je da gen koji je važan u *in vitro* eksperimentima možda nema tu funkciju *in vivo*, odnosno geni koji izgledaju beznačajni u *in vitro* esejima možda zapravo imaju važnu ulogu u toku prirodne infekcije (Chiang *et al.*, 1999). Jedan od pristupa proučavanju bakterijske patogeneze *in vivo* je komparativna hibridizaciona tehnika – „signature tagged mutagenesis“ (STM) – koja omogućava identifikovanje genskih lokusa koji doprinose preživljavanju patogena unutar domaćina (Chiang *et al.*, 1999). Koristeći ovu mutacionu tehniku determinante virulencije se definišu *in vivo*. Na taj način dobijen je mutant *M. avium* u genu koji je identifikovan kao gen odgovoran za sintezu poliketid sintaze 12 – *pkS12* gen.

O samom genu i funkciji njegovog produkta kod mikobakterija malo se zna. Kao što je već nekoliko puta do sada rečeno, dobro je poznato da neuobičajeno kompleksan ćelijski omotač mikobakterija ima važnu ulogu u njihovoj sposobnosti da budu uspešni patogeni tako da nije iznenađujuće da je sinteza ćelijskog omotača mikobakterija ciljna sekvenca nekih od najuspešnijih antimikobakterijskih lekova. Smatra se da je

dimikocerosil ftiocerol (DIM) – komponenta ćelijskog zida pojedinih mikobakterija - faktor virulencije, pošto su mutanti sojevi *M. tuberculosis* kojima nedostaje ova komponenta ćelijskog omotača atenuirani u humanim monocitima i u plućima miševa. Dimikocerol ftiocerol je kompleksan lipid. Čine ga ftiocerol esterifikovan sa polimetilovanim razgranatim masnim kiselinama (Sirakova *et al.*, 2003). Jedna grupa autora (Sirakova *et al.*, 2003) smatra da je *pks12* gen uključen u sintezu ftiocerola kod *M. tuberculosis*, mada uloga produkta *pks12* gena nije još uvek poznata. Oni tvrde da je remećenjem *pks12* gena sprečena produkcija DIM-a. Smatra se da DIM kod *M. tuberculosis* ima ulogu u permeabilnosti ćelijskog zida (doprinosi nepropustljivosti ćelijskog zida) i u njegovoj virulentnosti (Sirakova *et al.*, 2003). Iako eksperimentalni podaci podržavaju hipotezu da je DIM važan za virulenciju, efekat ovog molekula na imunski odgovor domaćina još uvek nije razjašnjen (Karakousis *et al.*, 2004).

Druga grupa autora pak, smatra da produkt *pks12* gena kod *M. tuberculosis* učestvuje u sintezi manozil- β -1-fosfomikoketida (strukturno raznovrsna familija manozil- β -1-fosfoizoprenoidnih jedinjenja koja se razlikuju po broju ugljenikovih atoma u alkanskom lancu), fosfolipidnih komponenti ćelijskog zida mikobakterija, za koje je pokazano da imaju antigenu aktivnost (Matsunaga *et al.*, 2004). Za razliku od DIM-a koji do sada nije izolovan iz *M. avium* (pronađen je kod *M. tuberculosis* i još nekih patogenih mikobakterija, ali ne i kod *M. avium*), manozil- β -1-fosfoizoprenoid (manozil- β -1-fosfomikoketid) je prvobitno i izolovan iz *M. avium*. Zapravo, jedini do sada izolovan lipid koji je prezentovan od strane CD1c ćelija je manozil- β -1-fosfoizoprenoid iz *M. avium* (Matsunaga *et al.*, 2004). Utvrđeno je da su manozil- β -1-fosfoizoprenoidna jedinjenja prisutna u ćelijskom omotaču patogenih mikobakterija, ali ne i kod saprofitskih

mikobakterija i drugih ne-mikobakterijskih patogena. Ova grupa autora je predložila hipotetički model sinteze ovih jedinjenja. Po njima je *pks12* jedan od gena koji je uključen u sintetički put fosfomikoketida. Struktura fosfomikoketida sugerise učešće poliketid sintaza, a Pks12 je dobar kandidat jer zadovoljava biohemijske/enzimske zahteve za sintezu fosfomikoketida, pošto poseduje odgovarajuće domene. Oni su takođe pokazali da delecija *pks12* gena u *M. tuberculosis* i *M. bovis* BCG dovodi do potpune obustave aktivacije CD1c ćelijskog odgovora i da rekonstrukcija gena dovodi do obnavljanja ovog T ćelijskog odgovora (Matsuga *et al.*, 2004).

Podaci o ovom genu i njegovom produktu u *M. avium* su krajnje šturi. Gen *pks12* je u *M. avium* identifikovan pretraživanjem biblioteke insercionih transpozonskih mutanata za nemogućnost preživljavanja u prisustvu subinhibitornih koncentracija ciprofloksacina, klaritromicina i penicilina, kao jedan od dva gena neophodna za urođenu („intrinsic“) multi rezistenciju (Philalay *et al.*, 2004). Kako je *pks12* gen konzerviran kod aktinomiceta i na osnovu visoke identičnosti (80%) i homologije (87%) na aminokiselinskom nivou sa Pks12 iz *M. tuberculosis*, autori su pretpostavili da je produkt ovog gena kod *M. avium* uključen u sintezu dimikocerosil fticerola, na osnovu rada Sirakova *et al.* (2003) u kom se smatra da *M. tuberculosis pks12* gen i njegov produkt učestvuju u sintezi ove komponente ćelijskog omotača. Doduše, napomenuto je i da funkcija Pks12 u sintezi DIM-a i/ili njemu sličnih jedinjenja nije potvrđena. Ova grupa autora (Philalay *et al.*, 2004) smatra da mutacija u *pks12* genu u *M. avium* dovodi do gubitka multi rezistencije najverovatnije usled povećane propustljivosti ćelijskog omotača. Bez obzira na to što trenutno nije poznato da li Pks12 zaista učestvuje u sintezi DIM-a ili pak fosfomikoketida, interesantna je činjenica da je ovaj gen tj. njegov produkt

povezan sa urođenom („intrinsic“) multi rezistencijom *M. avium* (Philalay *et al.*, 2004) i da je „signature tagged“ mutagenезom pokazano da je *pks12* gen važan za intracelularno preživljavanje *M. avium*.

Mutiranjem gena uključenog u sintezu komponente/i ćelijskog omotača i direktno merenje koncentracije hemijskih elemenata unutar pojedinačnih fagozoma u različitim fazama infekcije moguće je pružiti uvid u to šta se zapravo dešava unutar samog fagozoma - sa aspekta dostupnosti i/ili promene koncentracije neorganskih jona, za koje se zna da imaju krucijalnu ulogu u intracelularnom preživljavanju – bilo kroz kofaktorsku ulogu, bilo kao regulatori ekspresije gena.

Poređenje koncentracija gvožđa u fagozomima U937 ćelija koje su sadržale *pks12* mutante, u istim vremenskim periodima nakon infekcije kao i u prethodnim eksperimentima, je pokazalo postojanje statistički značajnog smanjenja koncentracije gvožđa od četiri puta ($192,43 \pm 46,85 \mu\text{M}$ u prvom satu nakon infekcije nasuprot $47,26 \pm 10,39 \mu\text{M}$ koncentraciji izmerenoj posle dvadeset i četiri sata; $p < 0,05$), baš kao što je detektovano i kod nepatogene mikobakterije, *M. smegmatis* u mišijim C57BL/6 makrofazima (doduše, smanjenje je bilo u većem stepenu – koncentracija u prva 24 sata opada 12 puta; Wagner *et al.*, 2005a). Iako je ovaj pad koncentracije gvožđa očekivan, imajući u vidu činjenicu da je *pks12* mutant atenuiran kako u *in vivo*, tako i u *in vitro* uslovima (lična komunikacija, prof. Bermudez L.), te da je trend opadanja koncentracije prisutan kod nepatogenih mikobakterija, na izvestan način je ipak iznenađujući. Bez obzira na to u kom biosintetskom putu produkt ovog gena učestvuje – da li je deo biosintetskog puta dimikocerosil ftiocerola, tačnije njegove ftiocerolne komponente ili učestvuje u sintezi fosfomikoketida, dveju komponenti ćelijskog omotača, jasno je da

odsustvo produkta *pks12* gena dovodi to takvih promena u strukturi i/ili funkciji ćelijskog omotača koje za posledicu imaju atenuaciju mutanta i nemogućnost zadržavanja gvožđa u fagozomima koji sadrže ove mutante, odnosno da dovodi do statistički značajnog pada u koncentraciji gvožđa posle 24 sata.

Pored promene, tj. pada koncentracije gvožđa u toku infekcije U937 ćelija sa *M. avium pks12* mutantom zabeležene su i promene u koncentracijama nekih drugih neorganskih jona kao i u koncentraciji drugih biološki značajnih elemenata kao što je fosfor. Možda je u tom smislu najinteresantnija promena koncentracije kalijuma u toku infekcije, tačnije povećanje njegove koncentracije u dvadest i četvrtom satu u odnosu na prvi sat, od 3,6 puta ($5,37 \pm 1,29$ mM nasuprot $19,60 \pm 6,09$ mM; $p < 0,05$). Istu promenu, povećanje koncentracije kalijuma u toku infekcije od 2,7 puta, smo uočili i kod *M. avium wt/U937* uzoraka. Iako je u prvom satu infekcije U937 ćelija sa *M. avium wt* i *pks12* mutantom detektovana razlika u koncentraciji kalijuma između ovih uzoraka (2,7 puta je manja koncentracija kalijuma u U937/wt uzorcima), posle dvadeset i četiri sata statistički značajne razlike nema. Kao što je već rečeno, promenu koncentracije kalijuma u toku infekcije, bilo sa patogenim, bilo sa nepatogenim mikobakterijama, nismo detektovali u drugom model sistemu, tj. u mišijim C57BL/6 makrofazima (Wagner *et al.*, 2005a). Međutim, statistički značajna promena koncentracije kalijuma je detektovana u fagozomima U937 ćelijama, bez obzira da li su ove ćelije bile inficirane *M. avium wt* ili pak njegovim *pks12* mutantom. Ovaj rezultat podržava ranije iznešenu mogućnost, da zapravo i na fagozomima makrofaga, iako do sada to nije pokazano, postoje kalijumski kanali, koji možda, kao što je nedavno pokazano za neutrofile, imaju važnu ulogu u njihovom baktericidnom dejstvu. U prilog ovoj pretpostavci (o značaju kalijuma za

baktericidno dejstvo makrofaga) idu i rezultati objavljeni nedavno i u radu Wagner i saradnika (2006) – gde je detektovana promena koncentracije kalijuma u toku infekcije BALB/c peritonealnih mišijih makrofaga *M. avium* wt, koji se od C57BL/6 mišijih peritonealnih makrofaga razlikuju po svojoj prijemčivosti na infekcije drugim, nemikobakterijskim intracelularnim patogenima (*Listeria monocytogenes*, *Leishmania major*, *Brucella abortus*) (Wagner *et al.*, 2006).

Pored promena u koncentraciji gvožđa i kalijuma, upotrebom mikroprobe sa tvrdim X zracima detektovane su u fagozomima U937 ćelija koji su sadržali *M. avium pks12* mutant promene koncentracija gotovo svih drugih elemenata koje je bilo moguće meriti ovom jedinstvenom metodom. Koncentracija fosfora 24 časa nakon infekcije opada čak 11 puta ($106,88 \pm 30,76$ mM nasuprot $9,5 \pm 5,68$ mM). Ovaj rezultat je svakako interesantan jer je fosfor hemijski element koji se u ćelijama nalazi kovalentno vezan. Iz kog razloga dolazi do pada koncentracije fosfora u fagozomima koji sadrže *pks12* mutant u toku infekcije za sada ostaje nerazjašnjeno. Pokazano je takođe da je koncentracija fosfora u prvom satu infekcije U937 ćelija sa *pks12* mutantom 3,5 puta viša u odnosu na istu vremensku tačku za U937/wt uzorak. Poređenje koncentracije kalcijuma u prvom satu sa dvadeset i četvrtim satom infekcije je pokazalo da u toku infekcije dolazi do pada koncentracije kalcijuma 18 puta ($105,03 \pm 31,72$ mM nasuprot $5,78 \pm 1,66$ mM; $p < 0,05$). Pored toga detektovana je razlika u koncentraciji kalcijuma u prvom satu između fagozoma U937 ćelija koji sadrže *M. avium* wt i onih koji sadrže *M. avium pks12* mutant. Koncentracija kalcijuma u potonjem uzorku je 8,8 puta viša nego u *M. avium* wt/U937 uzorku. Posle 24 sata razlika u koncentraciji kalcijuma između ova dva uzorka nestaje. Ovi rezultati sugerišu da u prvih sat vremena infekcije možda dolazi do snažnog influksa

kalcijuma u fagozome domaćina, i da se u vremenu do 24 sata nakon infekcije koncentracija kalcijuma na neki način nivelira.

Slično kalcijumu i koncentracija bakra drastično opada; čak je 26 puta manja posle dvadeset i četvrtog sata infekcije ($994,67 \pm 264,97 \mu\text{M}$ nasuprot $38,56 \pm 9,46 \mu\text{M}$; $p < 0,05$). Pad koncentracije bakra kod *M. avium* wt fagozoma U937 ćelija iznosi 5,6 puta, ali iako je blizak statističkoj značajnosti, nije je dostigao. Možda i u slučaju bakra, takođe dvovalentnog kationa, u prvih sat vremena infekcije U937 ćelija sa *pks12* mutantom koncentracija ovog neorganskog jona raste usled influksa, da bi u drugoj vremenskoj tački koncentracija bakra bila svedena na nivo prisutan u fagozomima koji sadrže virulentnu *M. avium* bakteriju. Koncentracija nikla se udesotostručuje posle 24 sata od infekcije ($0,46 \pm 0,35 \mu\text{M}$ nasuprot $4,64 \pm 1,54 \mu\text{M}$), dok pad koncentracije cinka od 2,4 puta ne dostiže statističku značajnost, baš kao ni pad koncentracije magana od 2,9 puta.

Sve detektovane promene u koncentraciji neorganskih jona u fagozomima koje je pokazao *M. avium pks12* mutant - one očekivane, i one neočekivane i bez trenutnog objašnjenja, uključujući pad koncentracije gvožđa, kalcijuma i bakra, pa i porast koncentracije kalijuma, ukazuju na to da produkt *pks12* gena – poliketid sintaza 12 ima ogroman uticaj na preživljavanje *M. avium* u nepovoljnim mikrosredinskim uslovima u kojima se može naći unutar makrofaga. Taj uticaj svakako nije samo putem promene u propustljivosti ćelijskog zida, kojom Philalay i saradnici (2004) objašnjavaju povećanu osetljivost na određene antibiotike, već Pks12 i njegov biosintetski produkt verovatno imaju aktivniju ulogu u virulentnosti ove patogene bakterije. Odsustvo produkta aktivnosti Pks12 izgleda da dovodi do promena u mikobakterijskom omotaču koje na neki način remete mehanizam zaustavljene maturacije fagozoma, zaštitnog znaka

mikobakterijske patogeneze, te se fagozom koji sadrži *pks12* mutant *M. avium* fuzioniše sa lizozomom u fagolizozom i biva uništen. Ako se ova pretpostavljena uloga Pks12 potvrdi, *pks12* gen bi mogao da bude dobra ciljna sekvenca nekim novim antimikobakterijskim lekovima.

Ne treba smetnuti sa uma kada se govori o *M. avium* da se o ovoj mikobakteriji jako malo u osnovi zna – za sada nisu jasni putevi transmisije ove bakterije, niti se zna dovoljno o njenom životnom ciklusu u spoljašnjoj sredini. Nepoznati su faktori koji dovode do toga da se ova oportunistička infekcija razvije, a i mehanizam zaustavljanja sazrevanja fagozoma, pogotovo kada su u pitanju efektorski mikobakterijski molekuli, je i dalje nejasan, iako su neki aspekti ovog mehanizma opisani, tako da svaki novi podatak vezan za intracelularni život ove bakterije ima svoju težinu, čak i onda kada trenutno nismo u mogućnosti da pružimo adekvatno objašnjenje rezultata. U stvari, svaku od promena koje su detektovane kako u fagozomima koji su sadržali *M. avium* wt, tako i u onim koji su sadržali njegov *pks12* mutant bi trebalo detaljnije ispitati u budućim istraživanjima – počevši sa koncentracijom gvožđa kod U937/wt uzorka, pa preko promene koncentracije kalijuma itd., jer u njihovom potpunom razumevanju leži ključ za razumevanje intracelularnog životnog ciklusa *M. avium*.

Za potpuno razumevanje virulencije *M. avium* zavisne od *pks12* gena definitivna identifikacija produkta ovog gena i određivanje njegovog mesta u ćelijskom metabolizmu mikobakterije je neophodno za razumevanje promena koncentracija elemenata u tragovima i drugih jona i elemenata od biloškog značaja detektovanih u ovom radu. Sa druge strane, do danas razlike u oksidativnim stanjima neorganskih jona, kao što je

gvožđe, nisu proučavane. Promena oksidativnog stanja gvožđa se očekuje u toku njegovog transporta ka i u fagozom koji sadrži mikobakteriju, kao i iz fagozoma u samu mikobakterijsku ćeliju. Mapiranje različitih stanja gvožđa bi svakako doprinelo boljem razumevanju patogenosti mikobakterija. Kako se u ovom radu na osnovu dobijenih rezultata sugerše postojanje kalijumskih kanala na fagozomalnoj membrani U937 ćelija i obzirom na pokazani značaj kalijuma u baktericidnom dejstvu neutrofila (Reeves *et al.*, 2002), deo budućih eksperimenata bi svakako trebao biti usmeren ka njegovoj identifikaciji.

Uvođenje jedne sasvim nove tehnike, novog pristupa proučavanju ćelijskih sadržaja pruža novi pogled na intracelularni život patogena kao što je *M. avium*. Mikroproba sa tvrdim X zracima, zahvaljujući svim svojim prednostima – počevši od visoke osetljivosti, mogućnosti istovremene detekcije velikog broja elemenata, pa sve do kvanfikacije detektovanih signala, bez potrebe za dodatnim bojenjem uzorka – u kombinaciji sa biohemijskim i molekularno biološkim tehnikama i metodama definitivno otvara nove mogućnosti u proučavanju izuzetno složenog životnog ciklusa intracelularnih patogena pružajući uvid u *in situ* dešavanja. U ovom radu su demonstrirane jedinstvene mogućnosti mikroprobe sa tvrdim X zracima u proučavanju intracelularnog sadržaja metala i njihove uloge u patogenosti bakterijskih infekcija.

Razvoj nanoprobe sa X zracima (završetak izgradnje CNM-a – Center for Nanomaterial Science, pri Advance Photon Source, Argonne National Laboratory, koja se očekuje početkom 2007. godine) sa boljom prostornom rezolucijom (~ 30 nm) od rezolucije mikroprobe (~ 100 nm) omogućio bi razlikovanje fagozomalnog sadržaja od elemenata koji se nalaze u mikobakterijskoj ćeliji. Sa druge strane, razvoj kriogenog

fiksiranja uzoraka (npr. „plunge-freezing“ potupkom) bi u budućnosti bilo poželjno, čime bi se obezbedila efikasnija imobilizacija hemijskih elemenata u uzorku, pre svega difusibilnih elemenata kao što su hlor i kalijum i na taj način bi se izbegli svi potencijali artefakti do kojih hemijsko fiksiranje može da dovede.

VI Zaključci

1. U toku prva 24 časa infekcije U937 humane ćelijske linije, modela za humanu mikobakterijemiju, sa *Mycobacterium avium* wt, promena koncentracije gvožđa u fagozomima koji sadrže patogen nije zabeležena iako je očekivana ($181,58 \pm 45,89 \mu\text{M}$ za 1h, nasuprot $109,08 \pm 80,34 \mu\text{M}$ 24h posle). Koncentracija gvožđa u fagozomima U937 ćelija koje su sadržale *M. avium pks12* mutant se statistički značajno smanjuje 4 puta ($192,43 \pm 46,85 \mu\text{M}$ u 1h, nasuprot $47,26 \pm 10,39 \mu\text{M}$ 24h posle), što je u skladu sa njegovom atenuacijom.
2. Statistički značajno povećanje koncentracije kalijuma od 2,7 puta u toku infekcije U937 ćelija sa *M. avium* wt ($14,6 \pm 3,16 \text{ mM}$ za 1h, odnosno $39,48 \pm 11,46 \text{ mM}$ za 24h), odnosno povećanje od 3,6 puta u toku infekcije sa *M. avium pks12* mutantom ($5,37 \pm 1,29 \text{ mM}$ za 1h, odnosno $19,60 \pm 6,09 \text{ mM}$ za 24h), koje nije zabeleženo kod infekcije C57BL/6 mišijih makrofaga, sugeriše postojanje kalijumskih kanala na fagozomalnim membranama humanih makrofaga, koji do sada na njima nisu identifikovani i njihovu ulogu u baktericidnom dejstvu, slično neutrofilima.
3. Koncentracija fosfora se nije menjala u toku infekcije u fagozomima U937 ćelija sa *M. avium* wt. Promene koncentracija kalcijuma (opada 2,7 puta) i nikla (raste 60 puta) nisu dostigle statističku značajnost, dok koncentracije bakra i cinka opadaju u toku infekcije 5,6, odnosno 4,6 puta (statistički značajno).

4. U fagozomima U937 ćelija inficiranih *M. avium pks12* mutantom u toku infekcije detektovan je pad koncentracije fosfora (11 puta), kalcijuma (18 puta) i bakra (26 puta). Koncentracija nikla se udesetostručuje, dok pad koncentracije mangana od 2,9 puta i cinka od 2,4 puta ne dostižu statističku značajnost.
5. Iako se sve promene u koncentracijama neorganskih jona u fagozomima sa *M. avium pks12* mutantnom trenutno ne mogu objasniti, one ukazuju na ogroman značaj produkta *pks12* gena za preživljavanje *M. avium* u nepovoljnim sredinskim uslovima unutar fagozoma. Verovatno Pks12 i njegov biosintetski produkt imaju i aktivnu ulogu u virulentnosti ove patogene bakterije, pored već pretpostavljene pasivne uloge (u virulentnosti).
6. Poređenje dobijenih koncentracija u fagozomima U937 ćelija sa ranije definisanom fagozomalnom mikrosredinom u C57BL/6 mišijim makrofazima inficiranim sa *M. avium* wt ukazuje na zavisnost mikrosredine specifične za patogene organizme u odnosu na domaćina, kao i na postojanje razlika u dinamici procesa regulacije koncentracije neorganskih jona u zavisnosti od domaćina.
7. Mikroproba sa tvrdim X zracima, zahvaljujući svim svojim prednostima (visoka osetljivost, mogućnost istovremene detekcije velikog broja elemenata i kvantifikacije detektovanih signala, odsustvo potrebe za dodatnim bojenjem) u kombinaciji sa biohemijским i molekularno-biološkim metodama otvara nove mogućnosti u proučavanju izuzetno složenog životnog ciklusa intracelularnih patogena.

VII Literatura

Abel, L., Sanchez, F.O., Oberti, J., Thuc, N.V., Hoe, L.V., Lap, V.D., Skamene, E. Lagrange, P.H. & Schurr, E. (1998) Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J Infect Dis.* **177**, p 133-145

Ahluwalia, J., Tinker, A., Clapp, L.H., Duchon, M.R., Abramov, A.Y., Pope, S., Nobles, M. & Segal, A.W. (2004) The large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel is essential for innate immunity. *Nature*, **427**, p 853-858

Ainsa, J.A., Martin, C. & Gisquel B. (2001) Molecular approaches to tuberculosis. *Molecular Microbiology*, **42(2)**, p 561-570

Armstrong, J. A. & d'Arcy-Hart, P. (1971) Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations of fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med*, **134**, p 713–740

Awomoyi, A.A., Marchant, A., Howson, J.M., McAdam, K.P., Blackwell, J.M. & Newport, M.J. (2002) Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis*, **186**, p 1808-1814

Baker D.R. & Anderson, A.J. (2000) The Canadian Light Source: Application of The Hard X-ray Microprobe to Geosciences, CSEG conference, May 29 – Jun 2, 2000, Canada (www.cseg.ca/conferences/2000/2000abstracts/915.PDF)

Barton, C.H., Biggs, T.E., Baker, S.T., Bowen, H. & Atkinson, P.G. (1999) Nramp1: a link between intracellular iron transport and innate resistance to intracellular pathogens. *J Leukoc Biol*, **66**, p 757-762

Basu, J. (2004) Mycobacteria within its intracellular niche: survival of the pathogen or its host? *Current Science*, **86(1)**, p 103-110

Bellamy, R., Ruwende, C., Corrah, T., McAdam, K.P., Whittle, H.C. & Hill, A.V. (1998) Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med*, **338**, p 640-644

Bermudez, L.E., Young, L.S. & Enkel, H. (1991) Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human macrophages: Roles of membrane receptors and serum proteins. *Infect Immun*, **59**, p 1697-1702

Bermudez, L.E., Parker, A. & Goodman, J.R. (1997) Growth within macrophages increases the efficiency of *Mycobacterium avium* invading other macrophages by a complement receptor-independent pathway. *Infect Immun*, **65**, p1916-25

Cai, Z., Lai, B., Ilinski, P., Legnini, D. & Maser J. (1999) A hard x-ray scanning microprobe for fluorescence imaging and microdiffraction at the Advance Photon Source. APS User Activity Report, Instrumentation and Techniques

Camacho, L.R., Constant, P., Raynaud, C., Laneelle, M-A., Triccas, J.A., Gicquel, B., Daffe, M. & Guilhot, C. (2001) Analysis of the Phthiocerol Dimycocerosate Locus of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, **276(23)**, p 19845-19854

Cangelosi, G., Clark-Curtiss, J., Behr, M., Bull, T., & Stinear T. (2004) Biology of waterborne pathogenic mycobacteria. World Health Organization. Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management. Edited by S. Pedley, J. Bartram, G. Ress, A. Dufour and J. Cortuvo. Published by IWA Publishing, London, UK

Chang, C.F., Shuman, H. & Somlyo, A.P. (1986) Electron probe analysis, X-ray mapping, and electron energy-loss spectroscopy of calcium, magnesium, and monovalent ions in log-phase and in dividing *Escherichia coli* B cells. *J Bacteriol.*, **167**, p 935-939

Chiang, S.L., Mekalanos, J.J. & Holden, D.W. (1999) *In vivo* genetic analysis of bacterial virulence. *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**, 129-154

Clemens, D. L. & Horwitz, M. A. (1995) Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med*, **181**, p 257–270

Clemens, D. L. & Horwitz, M. A. (1996) The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. *J Exp Med*, **184**, p 1349–1355

Cooper, A.M., Appelberg, R. & Orme, I.M. (1998) Immunopathogenesis of *Mycobacterium avium* infections. *Front Biosci*, **3**, e141-148

Cornelis, G.R., Boland, A., Boyd, A.P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.P. & Stainer, I. (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, p 1315-1352

Crowle, A. J., Dahl, R., Ross, E. & May, M. H. (1991). Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. *Infect Immun*, **59**, p 1823–1831

de Chastellier, C. & Thilo, L. (1997). Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to endocytic membranes and size of the phagocytic particle. *Eur J Cell Biol*, **74**, p 49–62.

de Chastellier, C., Lang, T. & Thilo, L. (1995). Phagocytic processing of the macrophage endoparasite, *Mycobacterium avium*, in comparison to phagosomes which contain *Bacillus subtilis* or latex beads. *Eur J Cell Biol*, **68**, p 167–182.

DeVoss, J.J., Rutter, K., Schroeder, B.G., Su, H., Zhu, Y. & Barry, C.E. III (2000) The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, p 1252-1257

Draper, P. (1998) The outer parts of the Mycobacterial envelope as permeability barriers. *Frontiers in Bioscience*, **3**, d1253-1261

Ferrari, G., Langen, H., Naito, M. & Pieters, J. (1999) A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell*, **97**, 435–447

Finlay, B.B. & Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, p 136-169

Forbes, J.R. & Gros, P. (2001) Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the surface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol*, **9**, p 397-403

Fratti, R. A., Chua, J., Vergne, I. & Deretic, V. (2003) *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, p 5437–5442

Frehel, C., de Chastellier, C., Lang, T. & Rastogi, N. (1986) Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. *Infect Immun*, **52**, p 252–262

Frehel, C., Canonne-Hergaux, F., Gros, P. & de Chastellier, C. (2002) Effect of Nramp1 on bacterial replication and on maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in bone marrow-derived macrophages. *Cell. Microbiol.*, **4** (8), p 541-556

Gomes, M.S., Paul, S., Moreira, A.L., Appelberg, R., Rabinovitz, M. & Kaplan, G. (1999) Survival of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* in acidified vacuoles of murine macrophages. *Infection and Immunity*, **67** (7), p 3190-3206

Gomes, M.S. & Appelberg, R. (2002) NRAMP1- or cytokine- induced bacteriostasis of *Mycobacterium avium* by mouse macrophages is independent of the respiratory burst. *Micorbiology*, **148**, p 3155-3160

Goren, M.B., D'Arcy Hart, P., Young, M.R. & Armstrong, J.A. (1976) Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **73**, p 2510–2514

Govani, G. & Gros, P. (1998) Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm Res*, **47**, p 277-284

Greenwell-Wild, T., Vazquez, N., Sim, D., Schito, M., Chatterjee, D. Orenstein J.M. & Wahl, S.M. (2002) *Mycobacterium avium* infection and modulation of human macrophage gene expression. *The Journal of Immunology*, **169**, p 6286-6297

Griffiths, P.D., Dobson, B.R., Jones, G.R. & Clarke D.T. (1999) Iron in the basal ganglia in Parkinson's disease - An *in vitro* study using extended X-ray absorption fine structure and cryo-electron microscopy. *Brain*, **122** (4), p 667-673

Grupa autora (2001) X-ray data booklet, Lawrence Berkley National Laboratory

Guérin, I. & de Chastellier, C. (2000) Disruption of the actin filament network affects delivery of endocytic contents marker to phagosomes with early endosome characteristics: the case of phagosomes with pathogenic mycobacteria. *Eur J Cell Biol*, **79**, p 735–749

Heldal, M., Scanlan, D.J., Norland, S., Thingstad, F. & Mann, N.H. (2003) Elemental composition of single cells of various strains of marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus* using X-ray microanalysis. *Limnology and Oceanography*, **48**, p 1732-1743

Hoppe, H.C., de Wet, B.J., Cywes, C., Daffe, M. & Ehlers, M.R. (1997) Identification of phosphatidylinositol mannoside as a mycobacterial adhesin mediating both direct and opsonic binding to nonphagocytic mammalian cells. *Infect Immun*, **65**, p 3896–3905.

Karakousis, P.C., Bishai, W.R. & Dorman, S.E. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cell. Microbiol.*, **6(2)**, p 105-116

Kemner, K.M., Kelly, S.D., Lai, B., Maser, J., O'Loughlin, E.J., Sholto-Douglas, D., Cai, Z., Schneegurt, M.A., Kulpa, C.F., Jr. & Nealson, K.H. (2004) Elemental and Redox Analysis of Single Bacterial Cells by X-ray Microbeam Analysis. *Science*, **306**, p 686-687

Kidd, M., Wolford, J.L., O'Halloran, T.V., Barrea, R. & Penner-Hahn, J.E. (2005) Metal distribution in the hippocampus. Workshop for High Resolution X-ray Analysis in Biological Systems: New Opportunities; Hosted by the Advance Photon Source and Northwestern University, APS/ANL, March 21-22, 2005

Kolattukudy, P.E., Fernandes, N.D. Azad, A.K., Fitzmaurice, A-M. & Sirakova, T.D. (1997) Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Molecular Microbiology*, **24(2)**, p 263-270

Kuhn, D.E., Lafuse, W.P. & Zwillig, B.S. (2001) Iron transport into *Mycobacterium avium*-containing phagosomes from an Nramp1 (Gly169)-transfected RAW264.7 macrophage cell line. *J Leukoc Biol*, **69**, p 43-49

Litwin, C.M. & Calderwood, S.B. (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.*, **6**, p 137-149

Mahan, J.M., Heithoff, D.M., Sinsheimer, R.L. & Low, D.A. (2000) Assessment of bacterial pathogenesis by analysis of gene expression in the host, *Annu. Rev. Genet.*, **34**, p139-164

Malik, Z. A., Iyer, S. S. & Kusner, D. J. (2001) *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome–lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages. *J Immunol*, **166**, p 3392–3401

Margaritondo, G. (2002) Elements of Synchrotron Light for Biology, Chemistry, and Medical Research. Oxford University Press

Maser, J. & Vogt, S. (2003). Hard X-ray microscopy. APS Internal Publication.

Maser, J., Wagner, D., Lai, B., Cai, Z., Legnini, D., Moric, I. & Bermudez, L. (2003). Trace metals and their relation to bacterial infections studied by X-ray microscopy. *J. Phys. IV France*, **104**, p 283-288

Matsunaga, I., Bhatt, A., Young, D.C., Cheng, T.-Y., Eyles, S.J., Besra, G.S., Briken, V., Porcelli, A.A., Costello, C.E., Jacobs, W.R. Jr. & Moody, D.B. (2004) *Mycobacterium tuberculosis pks12* Produces a Novel Polyketide Presented by CD1c to T cells. *J Exp Med*, **200(12)**, p 1559-1569

McGarvey, J.A. & Bermudez, L.E. (2001) Phenotypic and Genomic Analysis of the *Mycobacterium avium* Complex Reveal Differences in Gastrointestinal Invasion and Genomic composition. *Infection and Immunity*, **69**(12), p 7242-7249

McGarvey, J.A., Wagner, D. & Bermudez, L.E. (2004) Differential gene expression in mononuclear phagocytes infected with pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *Clin Exp Immunol*, **136**, p 490-500

Miller, J.F., Mekalanos, J.J. & Falkow, S. (1989) Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science*, **243**, p 916-922

Moody, D.B., Urlichs, T., Mühlecker, W., Young, D.C., Gurcha, S.S., Grant, E., Rosat, J.-P., Brenner, M.B., Costello, C.E., Besra, G.S. & Porcelli, S.A. (2000) CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nature*, **404**, p 884-888

Outten, C.E. & O'Halloran, T.V. (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*, **292**, p 2488-2492

Pais, T.F. & Appelberg, R. (2004) Induction of *Mycobacterium avium* growth restriction and inhibition of phagosome – endosome interaction during macrophage activation and apoptosis induction by picolinic acid plus IFN γ . *Microbiology*, **150**, p 1507-1518

Parrish, N.M., Kuhajda, F.P., Heine H.S., Bishai W.R. and Dick J.D (1999) Antimycobacterial activity of cerulenin and its effects on lipid biosynthesis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **43**, p 219–226

Paul, T.R. & Beveridge, T.J. (1994) Preservation of Surface Lipids and Determination of Ultrastructure of *Mycobacterium kansasii* by Freeze-Substitution. *Infection and Immunity*, **62(5)**, p 1542-1550

Philalay, J.S., Palermo, C.O., Hauge, K.A., Rustad, T.R & Cangelosi, G.A. (2004) Genes Required for Intrinsic Multidrug Resistance In *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48(9)**, p 3412-3418

Prescott, L.A., Harley, J.P. & Klein D. A. (1999) Microbiology, 4th edition, McGraw Hill

Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J. & Segal, A.W. (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature*, **416**, p 291-297

Rhoades, E.R. & Ullrich H.J. (2000) How to establish a lasting relationship with your host: Lessons learned from *Mycobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*, **78**, p301-310

Rhoades, E., Hsu, F.-F., Torrelles, J.B., Turk, J., Chatterjee D. and Russell, D.G. (2003) Identification and macrophage-activating activity of glycolipids released from intracellular *Mycobacterium bovis* BCG. *Molecular Microbiology*, **48(4)**, p 875–888

Russell, D. G., Dant, J. & Sturgill-Koszycki, S. (1996) *Mycobacterium avium*- and *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. *J Immunol*, **156**, p 4764–4773

Russell, D. G., Sturgill-Koszycki, S., Vanheyningen, T., Collins, H. & Schaible, U. E. (1997) Why intracellular parasitism need not be a degrading experience for *Mycobacterium*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **352**, p 1303–1310

Russell, D.G. (2001) *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Molecular Cell Biology*, **2**, p 569-577

Russell, D.G., Mwandumba, H.C & Rhoades, E.E. (2002) *Mycobacterium* and the coat of many lipids, *The Journal of Cell Biology*, **158(3)**, p 421-426

Saxena, P., Yadav, G., Mohanty, D. & Gokhale, RS. (2003) A new family of type III polyketide synthases in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.*, **278(45)**, p 44780-44790

Searle, S., Bright, N.A., Roach, T.I., Atkinson, P.G., Barton, C.H., Melen, R.H. & Blackwell, J.M. (1998) Localization of Nramp1 in macrophages: modulation and activation of infection. *J. Cell Sci.*, **111**, p 2855-2866

Sirakova, T.D., Dubey, V.S., Kim, H.-J., Cynamon, M.H. & Kolattukudy, P.E. (2003) The Large Open Reading Frame (*pks12*) in the *Mycobacterium tuberculosis* is Involved in Pathogenesis and Dimycocerosyl Phthiocerol Synthesis. *Infection and Immunity*, **71**(7), p3794-3801

Stokes, R.W. & Speert, D.P. (1995) Lipoarabinomannan inhibits nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to murine macrophages. *J Immunol*, **155**, p1361–1369.

Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P. H., Chakraborty, P. & 7 other authors (1994). Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*, **263**, 678–681

Sturgill-Koszycki, S., Schaible, U. E. & Russell, D. G. (1996) *Mycobacterium*-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J*, **15**, p 6960–6968

Touati, D. (2000) Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **373** (1), p 1-6

Vekemans, B., Vincze, L., Somogyi, A., Drakopoulos, M., L. Kempenaers, L., Snigirev A. & Adams F. (2001) 2001 Denver X-ray Conference, Steamboat Springs, Colorado, USA - 30th July - 3rd August 2001 (www.dxcicdd.com/01/pdf/F-24.PDF)

Venisse, A., Fournie, J.J., & Puzo, G. (1995) Mannosylated lipoarabinomannan interacts with phagocytes. *Eur J Biochem*, **231**, p 440–447

Vescovi, G.E., Soncini, F.C. & Groisman, E.A. (1996) Mg^{2+} as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell*, **84**, p 165-174

Via, L. E., Deretic, D., Ulmer, R. J., Hibler, N. S., Huber, L. A. & Deretic, V. (1997) Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem*, **272**, p 13326–13331

Vogt, S., Maser, J. & Jacobsen, C. (2003) Data analysis for X-ray fluorescence imaging. Proceedings of the Seventh International Conference on X-ray Microscopy. *J Phys IV*, **104**, p 617-622

Vogt, S. (2003) MAPS: a set of software tools for analysis and visualization of 3D X-ray fluorescence data sets. Proceedings of the Seventh International Conference on X-ray Microscopy. *J Phys IV*, **104**, p 635-638

Wagner, D., Maser, J., Lai, B., Cai, Z., Barry, C.E., 3rd, Höner zu Bentruo, K., Russell, D.G. & Bermudez, L.E. (2005a) Elemental analysis of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. *J Immunol*, **174**(3), p 1491-1500

Wagner, D., Maser, J., Moric, I., Boechat, N., Vogt, S., Gicquel, B., Lai, B., Reytrat, J-M. & Bermudez, L. (2005b) Changes of the phagosomal elemental concentrations by *Mycobacterium tuberculosis* Mramp. *Microbiology*, **151**, p 323-332

Wagner, D., Maser, J., Moric, I., Vogt, S., Kern, W.V. & Bermudez, L. (2006) Elemental analysis of the *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in macropages from Balb/c mice: Suggestion of a potassium channel in the phagosomal membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, **344**(4), p 1346-1351

Wang, L., Slayden, A., Barry, C.E. III & Liu J. (2000) Cell wall structure of a mutant of *Mycobacterium smegmatis* defective in the biosynthesis of mycolic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, **275** (10), p 7224-7229

Wolford, J. Kidd, M., Vost, S., Haldar, K., Penner-Hahn, J.E. & O'Halloran, T.V. (2005) The Inorganic Physiology of Malaria: Parasite Induced Changes in the zinc and iron chemistry of the Red Blood Cell. Workshop for High Resolution X-ray Analysis in

Biological Systems: New Opportunities; Hosted by the Advance Photon Source and Northwestern University, APS/ANL, March 21-22, 2005

Xu, S., Cooper, A., Sturgill-Koszycki, S., van Heyningen, T., Chatterjee, D., Orme, I., Allen, P. & Russell, D. G. (1994). Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *J Immunol*, **153**, p 2568–2578



М



РД 23328



300176209

COBISS