

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Saša KOPRIVEC

**OPREDELITEV LASTNOSTI NEVRAMINIDAZ IN
HEMAGLUTININOV IZ BAKTERIJ *Mycoplasma canis*
IN *Mycoplasma cynos***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Saša KOPRIVEC

**OPREDELITEV LASTNOSTI NEVRAMINIDAZ IN
HEMAGGLUTININOV IZ BAKTERIJ *Mycoplasma canis* IN
*Mycoplasma cynos***

DOKTORSKA DISERTACIJA

**CHARACTERISTICS OF NEURAMINIDASES AND
HAEMAGGLUTININS FROM BACTERIA *Mycoplasma canis* AND
*Mycoplasma cynos***

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Doktorska disertacija je zaključno delo podiplomskega doktorskega študija Bioznanosti (področje Biotehnologija) na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratorijih Katedre za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 4. 7. 2016 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija. Za mentorja je bil na seji senata Biotehniške fakultete dne 15. 5. 2013 imenovan znan. svet. dr. Dušan Benčina.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Mojca NARAT
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Članica: prof. dr. Nataša TOZON
 Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

Članica: doc. dr. Darja KEŠE
 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Datum zagovora: 7. 10. 2016

Podpisana izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Saša Koprivec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 601.4:577.21(043.3)
KG pasje mikoplazme/*Mycoplasma canis*/*Mycoplasma cynos*/virulenčni dejavniki/
sialidaza/nevraminidaza/hemaglutinin
AV KOPRIVEC, Saša, univ. dipl. bioteh.
SA BENČINA, Dušan (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski
program Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija
LI 2016
IN OPREDELITEV LASTNOSTI NEVRAMINIDAZ IN HEMAGLUTININOV IZ
BAKTERIJ *Mycoplasma canis* IN *Mycoplasma cynos*
TD Doktorska disertacija
OP XII, 85, [21] str., 10 pregl., 22 sl., 6 pril., 103 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI *Mycoplasma canis* in *Mycoplasma cynos* sta patogeni bakteriji, ki povzročata
okužbe pri psih. Povzročata obolenja urogenitalnega trakta in neplodnost ter okužbe
zgornjih in spodnjih dihal. Mehanizmi povzročanja bolezni še niso pojasnjeni. Kot
je to značilno za nekatere druge vrste mikoplazem, tudi *Mycoplasma canis* in
Mycoplasma cynos posedujeta molekule, ki so za pse imunogene in omogočajo
kolonizacijo gostitelja. Cilj naše raziskave je bil ugotoviti, ali imata ti dve bakteriji
hemaglutinine, ki omogočajo vezavo na receptorje s sialičnimi kislinami. Prav tako
smo žeeli pokazati, da je nevraminidaza dejavnik njune patogenosti in olajša
kolonizacijo tkiv gostitelja. Prvi smo identificirali in opisali hemaglutinin
Mycoplasma cynos, HapA. Dokazali smo, da gre za protein velik približno 65 kDa,
ki se lahko veže na pasje in kokošje eritrocite. Določili smo nukleotidno in
aminokislinsko zaporedje HapA različnih sevov *Mycoplasma cynos*. Na podlagi teh
podatkov smo pridobili rekombinantni protein rHapA. Pri *Mycoplasma canis* nam
je uspelo identificirati domnevni hemaglutinin HacA, ki je precej večji od HapA
(preko 200 kDa). Oba hemaglutinina prepoznavajo monoklonska protitelesa, ki smo
jih pridobili tekom raziskave (5G2 in 3B7 za HapA ter 3E3 za HacA). Nekateri sevi
so v testih hemaglutinacije dosegali titre tudi do 1 : 40000. Pomemben dejavnik
patogenosti je še encim nevraminidaza, ki ga posedujeta obe bakteriji. Nevraminidazna aktivnost je prisotna pri *M. canis*, *M. cynos* in *M. molare*.
Delovanje nevraminidaze negativno vpliva na vezavo hemaglutinina. Nevraminidaza cepi sialične vezi, ki hkrati predstavlja receptorska mesta za
vezavo hemaglutininov. Ti procesi se dogajajo tudi *in vivo*, saj imajo okuženi psi v
serumu velike količine specifičnih protiteles proti imunogenim molekulam
Mycoplasma canis in *Mycoplasma cynos*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 601.4:577.21(043.3)
CX canine mycoplasmas/*Mycoplasma canis*/*Mycoplasma cynos*/virulence factors/
sialidase/neuraminidase/haemagglutinin
AU KOPRIVEC, Saša
AA BENČINA, Dušan (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral
Programme in Biosciences, Scientific Field Biotechnology
PY 2016
TI CHARACTERISTICS OF NEURAMINIDASES AND HAEMAGGLUTININS
FROM BACTERIA *Mycoplasma canis* AND *Mycoplasma cynos*
DT Doctoral dissertation
NO XII, 85, [21] p., 10 tab., 22 fig., 6 ann., 103 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Mycoplasma canis* in *Mycoplasma cynos* are known pathogens that cause infections
in dogs. They effect the urogenital pathways, cause infertility and serious
respiratory infections. Mechanism of pathogenicity remain unknown. *Mycoplasma canis* and *Mycoplasma cynos* have molecules that are immunogenic and enable host
colonisation, as is the case with some other *Mycoplasma* species. The goal of our
investigation was to discover whether these two bacteria possess haemagglutinins
that would enable them to bind to host cell receptors containing sialic acid. We also
wanted to show that their neuraminidase is an important contributor to
pathogenicity of strains and facilitates tissue colonisation. We have been the first to
describe *Mycoplasma cynos* haemagglutinin HapA, an approximately 65 kDa
protein, that can bind chicken and dog erythrocytes. We have determined the
nucleotide and aminoacid sequence of different *Mycoplasma cynos* strains. Based
on discovered data we were able to generate a recombinant (rHapA) protein. We
have also managed to identify the haemagglutinin HacA of *Mycoplasma canis*, that
shows a molecular mass of over 200 kDa in our western blot experiments.
Monoclonal antibodies 5G2 and 3B7 to HapA and 3E3 to HacA were produced in
our research. Some strains even reached titres as high as 1 : 40000 in
haemagglutination assays. An important factor contributing to pathogenicity of *M. canis*, *M. cynos* and *M. molare* is their neuraminidase. Neuraminidase has a
negative effect on haemagglutinin binding to its receptors, as it cleaves sialic acid
bound to these receptors. Based on the number of specific antibodies to canine
mycoplasmas found in different dog sera tested in this study, we assumed these
processes also occur *in vivo*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MIKOPLAZME	3
2.1.1 Taksonomija in filogenija	3
2.1.2 Splošne značilnosti	5
2.1.3 Živiljenjsko okolje, gostitelji in povzročanje okužb	6
2.1.4 Genom	6
2.1.5 Mehanizmi patogeneze	7
2.1.5.1 Vezava na receptorje gostiteljskega tkiva	8
2.1.5.2 Invazija v gostiteljske celice	8
2.1.5.3 Poglavitni imunogeni proteini mikoplazem	9
2.1.5.4 Proteazna aktivnost	9
2.1.5.5 Nukleazna aktivnost	9
2.1.5.6 Mehanizmi izogibanja imunskemu odzivu gostitelja	10
2.1.5.7 Modulacija imunskega sistema	10
2.2 PASJE MIKOPLAZME	11
2.2.1 Identifikacija vrst	12
2.2.2 Obolenja, ki jih povzročajo pasje mikoplazme	12
2.2.3 Dihalne poti in <i>Mycoplasma cynos</i>	13
2.2.4 Urogenitalne poti in <i>Mycoplasma canis</i>	13
2.2.5 Anemija	14
2.2.6 Zdravljenje	14
2.3 VIRULENČNI DEJAVNIKI PASJIH MIKOPLAZEM	14

2.3.1	Nevraminidaza (sialidaza) in sialične kisline	15
2.3.2	Hemaglutinin	17
3	MATERIALI IN METODE	19
3.1	VRSTE IN SEVI MIKOPLAZEM	19
3.1.1	Gojišča za gojenje mikoplazem	19
3.1.1.1	Tekoče gojišče za mikoplazme	19
3.1.1.2	Agarsko gojišče za mikoplazme	21
3.1.1.3	Tekoče gojišče brez proteinov z večjo molekulske maso	21
3.2	IZOLACIJA IN ANALIZE NUKLEINSKIH KISLIN	21
3.2.1	Začetni oligonukleotidi	21
3.2.1.1	Pomnoževanje tarčnih genov <i>M. canis</i>	21
3.2.1.2	Pomnoževanje genov za nevraminidazo in hemaglutinin <i>M. cynos</i>	23
3.2.2	Izolacija genomske DNA in določanje koncentracije	25
3.2.3	Verižna reakcija s polimerazo	25
3.2.4	Elektroforeza genomske DNA in produktov PCR v agaroznem gelu	25
3.2.5	Določanje nukleotidnega zaporedja	27
3.2.6	Analiza nukleotidnih zaporedij z bioinformacijskimi orodji	27
3.2.7	Izolacija RNA ter prepis v cDNA	27
3.3	PRIPRAVA SPECIFIČNIH PROTITELES	28
3.3.1	Priprava antigena za imunizacijo	28
3.3.2	Imunizacija	28
3.3.3	Priprava mišje mielomske linije NS-07	29
3.3.4	Fuzija	30
3.3.5	Selekcija klonov	30
3.3.6	Pridobivanje protiteles	30
3.4	PRIPRAVA REKOMBINANTNEGA PROTEINA HapA	31
3.4.1	Kompetentne celice <i>Escherichia coli</i>	31
3.4.2	Začetni oligonukleotidi za pripravo rekombinantnega proteina	31
3.4.3	LB (Luria-Bertani) tekoče in trdno gojišče	31
3.4.4	Priprava vključka genomske DNA za kloniranje	32
3.4.5	Izbira in priprava vektorja ter PCR pomnožka	33
3.4.6	Ligacija DNA	34
3.4.7	Transformacija kompetentnih celic	34
3.4.8	Preverjanje vgradnje vključka	35

3.4.9	Gojenje transformiranih celic in sinteza rekombinantnega proteina	35
3.4.10	Izolacija rekombinantnega proteina	35
3.5	ANALIZE PROTEINOV	36
3.5.1	SDS-PAGE in prenos western	36
3.5.2	Encimsko imunski test DIBA	38
3.5.3	Sproščanje proteinov <i>M. cynos</i> in <i>M. canis</i> v tekoče gojišče s proteini nizkih molekulskih mas (low-protein medium)	38
3.5.4	Izolacija hemaglutinina HapA <i>M. cynos</i>	39
3.5.5	Izolacija hemaglutinina HacA <i>M. canis</i>	39
3.5.6	Elektroelucija proteinov	39
3.5.7	Določanje aminokislinskega zaporedja hemaglutinina HapA <i>M. cynos</i>	40
3.5.8	Določanje aminokislinskega zaporedja hemaglutinina HacA <i>M. canis</i>	40
3.6	ANALIZA NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI (NEAC)	41
3.6.1	Priprava celic mikoplazem	41
3.6.2	Nevraminidazna aktivnost	41
3.6.3	Vpliv denaturacijskih pogojev na delovanje nevraminidaze	41
3.7	ANALIZA SPECIFIKE VEZAVE NA RECEPTORJE S SIALIČNO KISLINO	42
3.7.1	Pasji serumi, ki smo jih preiskovali na prisotnost specifičnih protiteles	42
3.7.2	Testi desializacije glikoproteinov	42
3.8	HEMAGLUTINACIJA IN INHIBICIJA HEMAGLUTINACIJE	43
3.8.1	Določanje lokacije hemaglutinina na kolonijah <i>M. canis</i> in <i>M. cynos</i>	44
3.8.2	Hemadsorpcija	44
4	REZULTATI	45
4.1	NEVRAMINIDAZA <i>M. canis</i> IN <i>M. cynos</i>	45
4.1.1	Analiza nevraminidazne aktivnosti	45
4.1.2	Določanje nukleotidnega in aminokislinskega zaporedja nevraminidaze sevov <i>M. canis</i>	47
4.1.3	Določanje nukleotidnega in aminokislinskega zaporedja nevraminidaze sevov <i>M. cynos</i>	49
4.1.4	Testi desializacije glikoproteinov	50
4.2	IDENTIFIKACIJA IN KARAKTERIZACIJA HEMAGLUTININA HapA <i>M. cynos</i>	53
4.2.1	Hemaglutinacijska sposobnost <i>M. cynos</i>	54

4.2.2	IIPA in hemadsorpcija (HAD) eritrocitov na nativne kolonije <i>M. cynos</i>	55
4.2.3	Izločanje hemaglutinina v tekoče gojišče s proteini nizkih molekulskih mas	55
4.2.4	Izolacija hemaglutinina HapA preko vezave na eritrocite	56
4.2.5	Določitev aminokislinskega zaporedja HapA in identifikacija na genetskem nivoju	57
4.2.6	<i>hapA</i> podobni geni in njihova ekspresija pri različnih sevih <i>M. cynos</i>	58
4.3	IDENTIFIKACIJA HEMAGLUTININA HacA <i>M. canis</i>	59
4.3.1	Hemaglutinacijska sposobnost in hemadsorbcija <i>M. canis</i>	59
4.3.2	Izločanje hemaglutinina v tekoče gojišče s proteini nizkih molekulskih mas in vezava na eritrocite	60
4.3.3	Identifikacija proteina in gena za hemaglutinin HacA <i>M. canis</i>	60
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	62
5.1	RAZPRAVA	62
5.2	SKLEPI	70
6	POVZETEK (SUMMARY)	72
6.1	POVZETEK	72
6.2	SUMMARY	73
7	VIRI	75

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prikaz filogenetskih skupin in gruč znotraj rodu <i>Mycoplasma</i> (Ludwig in sod., 2011)	4
Preglednica 2: Vrste pasjih mikoplazem in nekatere njihove značilnosti (prirejeno po Chalker, 2005)	11
Preglednica 3: Seznam uporabljenih vrst in sevov mikoplazem.	20
Preglednica 4: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za pomnoževanje tarčnih genov <i>M. canis</i>	23
Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za pomnoževanje tarčnih genov <i>M. cynos</i>	24
Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za pripravo genskega vključka <i>rhapA</i> in preverjanje pravilnosti vstavitve genskega konstrukta.....	31
Preglednica 7: Recept za pripravo ločevalnega in nanašalnega gela za SDS-PAGE.....	36
Preglednica 8: Seznam uporabljenih pasjih serumov za teste HI, HAD, IIPA in desializacije.	42
Preglednica 9: Pregled nevraminidazne aktivnosti pri različnih kulturah in sevih pasjih mikoplazem.	46
Preglednica 10: Pregled sorodnih genov za nevraminidazo <i>M. cynos</i> in pomembnih biokemijskih lastnosti pripadajočih proteinov.....	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz morfologije celic in kolonij različnih vrst mikoplazem	5
Slika 2: <i>Mycoplasma cynos</i> H831	13
Slika 3: Pregled postavitve začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena za nevraminidazo <i>M. canis</i>	22
Slika 4: Velikostna lestvica za agarozno elektroforezo.....	26
Slika 5: Grafični prikaz sestave plazmidnega vektorja pQE-30 Xa s prikazom pozicije restriktičkih mest znotraj MCS	33
Slika 6: Prikaz kontrolnih lis velikostnega proteinskega markerja PageRuler Prestained Protein Ladder	37
Slika 7: Izvedba testa določanja nevraminidazne aktivnosti	47
Slika 8: Prikaz razlik NEAC pri klonih <i>M. cynos</i> 105	47
Slika 9: Grafični prikaz sekundarne proteinske strukture nevraminidaze <i>M. canis</i> Larissa	48
Slika 10: Grafični prikaz sekundarne proteinske strukture nevraminidaze <i>M. cynos</i> H831 ^T	50
Slika 11: Prikaz značilnih motivov v aminokislinskem zaporedju nevraminidaze <i>M. cynos</i> H831 ^T	50
Slika 12: Test pasjih serumov na vsebnost protiteles proti pasjim mikoplazmam	51
Slika 13: <i>M. cynos</i> odceplja sialično kislino, ki je na fetuin vezana preko $\alpha(2,3)$ vezi.....	52
Slika 14: Desializacija kontrolnih glikoproteinov fetuina in transferina.....	53

Slika 15: HA različnih sevov <i>M. cynos</i>	54
Slika 16: Reakcije monoklonskih protiteles 5G2 z nativnimi kolonijami <i>M. cynos</i> v posrednjem imunoperoksidaznem testu.....	55
Slika 17: Analiza imunogenih proteinov <i>M. cynos</i>	56
Slika 18: Dokazovanje hemaglutinina HapA <i>M. cynos</i> 896.....	57
Slika 19: Analiza vzorcev <i>M. cynos</i> 896 na prisotnost HapA	58
Slika 20: HapA pri različnih <i>M. cynos</i> sevih	59
Slika 21: Domnevni hemaglutinin HacA <i>M. canis</i> Larissa	60
Slika 22: HacA pri različnih sevih <i>M. canis</i>	61

KAZALO PRILOG

Priloga A: Shematski prikaz poteka in metod dela.

Priloga B: Prikaz postavitve začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje dveh genov za nevraminidazo pri sevih *M. cynos*.

Priloga C: Poravnavo nukleotidnih zaporedij *hapA* podobnih genov pri različnih sevih *M. cynos*.

Priloga D: Poravnavo aminokislinskega zaporedja nevraminidaz *M. canis* PG14^T in *M. canis* Larissa.

Priloga E: Poravnavo aminokislinskega zaporedja nevraminidaz različnih sevov *M. cynos*.

Priloga F: Rezultati določanja aminokislinskega zaporedja HacA z masno spektrometrijo, prikaz določenih peptidov na zaporedju proteina *M. canis* UF G1.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APS	amonijev persulfat (angl. <u>a</u> mmonium <u>p</u> ersulfate), $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
BAL	bronhoalveolarni izpirek (angl. <u>b</u> roncho <u>a</u> lveolar <u>l</u> avage)
BIN	natrijeva sol 5-bromo-4 kloro-3-indolil- α -D-N-acetilnevraminske kisline (angl. 5- b romo-4-chloro-3- <u>i</u> ndolyl- α -D-N-acetyl <u>n</u> euraminic acid sodium salt)
β-NAD	beta-nikotinamid adenin dinukleotid
bp, kbp	bazni par, kilo bazni par (1000 nukleotidov)
BSA	goveji serumski albumin (angl. <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
CIRD	pasja respiratorna okužba (angl. <u>c</u> anine <u>i</u> nfectious <u>r</u> espiratory <u>d</u> isease)
CFU	kolonijska enota (angl. <u>c</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nits)
Da, kDa	dalton oz. kilodalton, enota za izražanje molekulske mase proteinov
DEPC	dietilpirokarbonat (angl. <u>d</u> ie <u>e</u> thyl <u>p</u> yro <u>c</u> arbonate)
DIBA	točkovna imunodetekcija (angl. <u>d</u> ot <u>i</u> mmon <u>b</u> inding <u>a</u> ssay)
DMEM	Dulbeccova modifikacija Eaglovega gojišča za gojenje celic (angl. <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agles <u>M</u> edium)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <u>d</u> eoxyribon <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ (angl. <u>e</u> thylenediaminetetra- acetic <u>a</u> cid)
ELISA	encimskoimunski test (angl. <u>e</u> ncyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay)
FBS	goveji fetalni serum (angl. <u>f</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum)
g	težni (gravitacijski) pospešek
HA	hemaglutinacija
HAD	hemadsorpcija
HapA	hemaglutinin A <i>M. cynos</i>
HacA	hemaglutinin A <i>M. canis</i>

HRP	encim hrenova peroksidaza (angl. <u>horseradish</u> peroxidase)
IEF	izoelektrično fokusiranje, ločevanje proteinov na podlagi izoelektrične točke
IgG	imunoglobulini razreda G
IIPA	posredni imunoperoksidazni test (angl. <u>indirect</u> immunoperoxidase assay)
IPTG	izopropil β -D-1 tiogalakto piranozid, $C_9H_{18}O_5S$ (angl. isopropyl β -D-1- <u>thiogalactopyranoside</u>)
LB	Luria-Breton gojišče
M	mol l ⁻¹ , enota za izražanje koncentracije raztopine
MAA	aglutinin iz <i>Maackia amurensis</i>
MCS	mesto kloniranja pri vektorju (angl. <u>multiple</u> cloning site)
Milli-Q	filtrirana in deionizirana voda
NAD	nikotin adenin dinukleotid, $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$
NEAC	nevraminidazna encimska aktivnost (angl. <u>neuraminidase</u> enzymatic activity)
PBS	fosfatni pufer (angl. phosphate buffered saline)
PEG	polietilen glikol, $C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$
PRR	regija v aminokislinskem zaporedju, ki je bogata s prolini (angl. proline rich region)
PVDF	poliviliniden fluorid, $-(C_2H_2F_2)_n-$
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov v raztopini
SDS	natrijev dodecil sulfat
SDS-PAGE	gelska poliakrilamidna elektrofreza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata
SNA	aglutinin iz <i>Sambucus nigra</i>
TEMED	tetrametil etilendiamin, $C_6H_{16}N_2$
Tm	temperatura taljenja primerjev (angl. melting temperature)

1 UVOD

Mikoplazme so najmanjši prokarionti, sposobni samostojnega podvojevanja. Za ostale celične funkcije pa se v veliki meri zanašajo na svoje gostitelje. Med drugim okužujejo perutnino, govedo, pse, mačke in tudi človeka. Med približno dvajsetimi vrstami pasjih mikoplazem izstopata *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*) in *Mycoplasma canis* (*M. canis*), ki povzročata resna obolenja dihalnih in urogenitalnih poti. Mehanizmi patogenega delovanja in molekule, ki omogočajo kolonizacijo gostiteljskega tkiva, ostajajo nepojasnjeni (Chalker, 2005).

Mehanizmi patogeneze drugih vrst mikoplazem vključujejo predvsem pritrditev na površino gostiteljskih celic preko specifičnih receptorjev in njihovo invazijo (Dušanić in sod., 2009) ter izogibanje imunskemu odgovoru gostitelja, tudi z izražanjem visoko variabilnih površinskih proteinov, ki prepoznavajo receptorje na celicah gostitelja (Citti in sod., 2010).

Tudi *M. canis* in *M. cynos* imata proteine, ki jima omogočajo višjo stopnjo preživetja v gostitelju. Njuna nevraminidaza (Berčič in sod., 2012) verjetno predstavlja prednost pri pridobivanju hranič iz okolja ter olajša kolonizacijo tarčnega tkiva. Glikoproteini sluzi v sapniku, dihalih in vagini namreč vsebujejo sialično kislino, ki med drugim povečuje neprehodnost in onemogoča bakterijam dostop do spodaj ležečih epitelnih površin. Z desializacijo pasjih glikoproteinov si ta dva patogena mikroorganizma omogočita prost prehod do tarčnega tkiva in si posredno zagotovita substrate za celični metabolizem. Do sedaj niso bili preučeni procesi desializacije molekul, ki vsebujejo sialično kislino vezano preko $\alpha(2,3)$ ali $\alpha(2,6)$ glikozidne vezi. Prav tako encim nevraminidaza pri sevih pasjih mikoplazem ni bil okarakteriziran na genetskem nivoju ali nivoju proteinske strukture.

Pomemben dejavnik imunogenosti so hemaglutininini, ki so bili do sedaj opisani le pri nekaterih vrstah mikoplazem. Da lahko preživijo v gostitelju, so te patogene bakterije razvile mehanizme za spremenljivo izražanje svojih površinskih (lipo)proteinov. Najbolje so preučeni hemaglutininini ptičjih patogenih bakterij *Mycoplasma synoviae* in *Mycoplasma gallisepticum*. Do sedaj hemaglutininini *M. canis* in *M. cynos* niso bili opredeljeni in opisani, raziskovalci pa poročajo o sposobnosti vezave eritrocitov v testih hemaglutinacije oz. hemadsorbcije (Tully, 1983).

Nove informacije o mehanizmih patogeneze in molekulah, ki omogočajo povzročanje okužb, bi nedvomno pomagale premakniti meje na področju odkrivanja in zdravljenja subkliničnih okužb. Okuženi psi *in vivo* sintetizirajo specifična protitelesa. Predvsem v klinični praksi nam primankuje metod za detekcijo in hiter odziv ob redkih znakih sicer latentnih obolenj.

Namen doktorske disertacije je bil bolje opredeliti imunogene molekule pasjih mikoplazem *M. cynos* in *M. canis*. Nevraminidaze in hemaglutinini še niso dobro opredeljeni, zato smo želeli določiti njihovo primarno strukturo na genskem in proteinskem nivoju. Zanimalo nas je tudi njuno delovanje, medsebojna interakcija in kakšne so posledice v stanju okužbe pri psih.

1.1 HIPOTEZE

V doktorski disertaciji smo želeli preveriti naslednje zastavljene hipoteze:

- Aminokislinsko zaporedje nevraminidaze *M. cynos* je za približno 200 aminokislin krajše od aminokislinskega zaporedja nevraminidaze *M. canis*;
- Aminokislinska zaporedja nevraminidaz se razlikujejo med sevi posameznih vrst pasjih mikoplazem;
- Nevraminidaze *M. canis*, *M. cynos* in *M. molare* so encimsko aktivne in desializirajo glikoproteine;
- Prihaja do razlik v učinkovitosti odcepljanja sialične kisline vezane preko $\alpha(2,3)$ in $\alpha(2,6)$ glikozidne vezi;
- Hemaglutinini *M. canis* in *M. cynos* so imunogeni membranski (lipo)proteini;
- Gostitelji proti hemaglutininom pasjih mikoplazem sprožijo imunski odziv in tvorijo protitelesa, tudi taka, ki mikoplazmi preprečujejo vezavo na eritrocite in celice s podobnimi receptorji;
- Hemaglutinini sorodnih vrst mikoplazem imajo podobno specifičnost vezanja (na receptorje s sialično kislino).

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKOPLAZME

Rod *Mycoplasma* (deblo *Tenericutes*, razred *Mollicutes*, red *Mycoplasmatales*, družina *Mycoplasmataceae*) (Ludwig in sod., 2011) zajema skupino preprostih prokariontskih mikroorganizmov, katerih glavne značilnosti so majhen genom in popolna odsotnost celične stene (Rottem, 2003). Njihov minimalni set genov ravno še zadostuje potrebam za vzdrževanje celičnega načina življenja (Sirand-Pugnet in sod., 2007).

V naravi so razširjene predvsem kot paraziti in izkazujejo visoko stopnjo gostiteljske in tkivne specifike (Razin in sod., 1998). Znotraj rodu *Mycoplasma* je opisanih že preko 120 vrst (Taxonomy Browser, 2016) in sekvenciranih okoli 80 genomov (Genome, 2016), med drugim tudi genoma *Mycoplasma canis* in *Mycoplasma cynos* (Brown in sod., 2012; Walker in sod., 2013). Človeške in živalske mikoplazme naseljujejo površine sluznic dihal in urogenitalnih poti, oči, žrela ter mlečne žleze in sklepov (Razin in sod., 1998). Pri živalih najbolj pogosto povzročajo kronična obolenja (Frey, 2002).

Predstavniki rodu *Mycoplasma* lahko aktivirajo imunski sistem gostitelja, vplivajo na delovanje makrofagov in indukcijo citokinov. Njihove celične komponente delujejo kot antigeni, kot odziv na okužbo pa lahko pride pri gostitelju do razvoja avtoimunskih reakcij (Razin in sod., 1998). Za uspešno kolonizacijo gostitelja in povzročitev okužbe se morajo pritrđiti na celice tarčnega tkiva, nekatere vrste pa celo vstopajo v celice in se s tem izognejo delovanju imunskega sistema gostitelja (Dušanić in sod., 2009; Rottem, 2003).

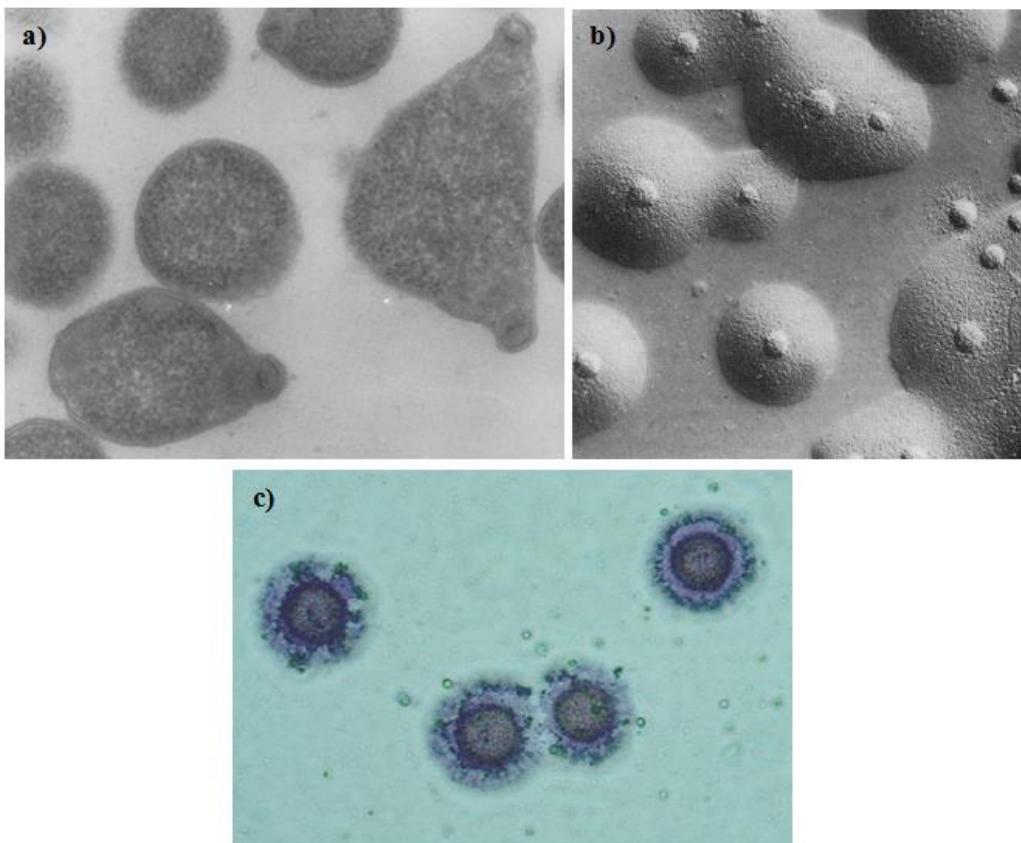
2.1.1 Taksonomija in filogenija

Rod *Mycoplasma* je po naravi polifiletski, kar pomeni, da so vrste znotraj rodu potomci več različnih prednikov. To hkrati pomeni tudi, da taksonomska razporeditev organizmov znotraj rodu ni vedno povezana s filogenetskimi značilnostmi, t.j. s homologijo organizmov (Johansson in Pettersson, 2002). Znotraj rodu ločimo več filogenetskih skupin in gruč, kar je prikazano v preglednici 1.

Preglednica 1: Prikaz filogenetskih skupin in gruč znotraj rodu *Mycoplasma* (Ludwig in sod., 2011).
Table 1: Phylogenetical distribution of groups inside the order *Mycoplasma* (Ludwig et al., 2011).

Skupina	Gruča	Vrste znotraj gruče
1. skupina	<i>M. mycoides</i>	<i>M. mycoides</i> , <i>M. capricolum</i> , <i>M. cottewii</i> , <i>M. putrefaciens</i> , <i>M. yeatsii</i>
2. skupina: Hominis	a) <i>M. bovis</i>	<i>M. adleri</i> , <i>M. agalactiae</i> , <i>M. bovigenitalium</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. californicum</i> , <i>M. caviae</i> , <i>M. columbinasale</i> , <i>M. columbinum</i> , <i>M. felifaicum</i> , <i>M. fermentas</i> , <i>M. gallinarum</i> , <i>M. iners</i> , <i>M. leopharyngis</i> , <i>M. lipofaciens</i> , <i>M. maculosum</i> , <i>M. meleagridis</i> , <i>M. opalescens</i> , <i>M. phocirhinis</i> , <i>M. primatum</i> , <i>M. simbae</i> , <i>M. spermatophilum</i>
	b) <i>M. equigenitalium</i>	<i>M. elephantis</i> , <i>M. equigenitalium</i>
	c) <i>M. hominis</i>	<i>M. alkalescens</i> , <i>M. anseris</i> , <i>M. arginini</i> , <i>M. arthritidis</i> , <i>M. auris</i> , <i>M. buccale</i> , <i>M. canadense</i> , <i>M. cloacale</i> , <i>M. equirhinis</i> , <i>M. falconis</i> , <i>M. faucium</i> , <i>M. gateae</i> , <i>M. gypis</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. hyosynoviae</i> , <i>M. indiense</i> , <i>M. orale</i> , <i>M. phocicerebrale</i> , <i>M. phocidae</i> , <i>M. salivarium</i> , <i>M. spumans</i> , <i>M. subdolum</i>
	č) <i>M. lipophilum</i>	<i>M. hyopharyngis</i> , <i>M. lipophilum</i>
	d) <i>M. neurolyticum</i>	<i>M. bovoculi</i> , <i>M. collis</i> , <i>M. cricetuli</i> , <i>M. conjunctivae</i> , <i>M. dispar</i> , <i>M. flocculare</i> , <i>M. hyopneumoniae</i> , <i>M. hyorhinis</i> , <i>M. iguanae</i> , <i>M. lagogenitalium</i> , <i>M. molare</i> , <i>M. neurolyticum</i> , <i>M. ovipneumoniae</i>
	e) <i>M. pulmonis</i>	<i>M. agassizii</i> , <i>M. pulmonis</i> , <i>M. testudineum</i>
	f) <i>M. sualvi</i>	<i>M. moatsii</i> , <i>M. mobile</i> , <i>M. sualvi</i>
	g) <i>M. synoviae</i>	<i>M. alligatoris</i> , <i>M. anatis</i> , <i>M. bovirhinis</i> , <i>M. buteonis</i> , <i>M. canis</i> , <i>M. citelli</i> , <i>M. columborale</i> , <i>M. corogypi</i> , <i>M. crocodyli</i> , <i>M. cynos</i> , <i>M. edwardii</i> , <i>M. felis</i> , <i>M. gallinaceum</i> , <i>M. gallopavonis</i> , <i>M. glycophilum</i> , <i>M. lenoicaptivi</i> , <i>M. musteale</i> , <i>M. oxoniensis</i> , <i>M. pullorum</i> , <i>M. sturni</i> , <i>M. synoviae</i> , <i>M. verecundum</i>
3. skupina: Pneumoniae	a) <i>M. fastidiosum</i>	<i>M. cavipharyngis</i> , <i>M. fastidiosum</i>
	b) hemotrofi	<i>M. coccoides</i> , <i>M. haemocanis</i> , <i>M. haemofelis</i> , <i>M. haemomuris</i> , <i>M. ovis</i> , <i>M. suis</i> , <i>M. wenyonii</i>
	c) <i>M. muris</i>	<i>M. iowae</i> , <i>M. microti</i> , <i>M. muris</i> , <i>M. penetrans</i>
	č) <i>M. pneumoniae</i>	<i>M. alvi</i> , <i>M. amphoriforme</i> , <i>M. gallisepticum</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>M. imitans</i> , <i>M. pirum</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>M. testudinis</i>
	d) rod <i>Ureaplasma</i>	<i>U. urealyticum</i> , <i>U. canigenitalium</i> , <i>U. cati</i> , <i>U. diversum</i> , <i>U. felinum</i> , <i>U. gallorale</i> , <i>U. parvum</i>

2.1.2 Splošne značilnosti



Slika 1: Prikaz morfologije celic in kolonij različnih vrst mikoplazem. a) Različno oblikovane celice *M. gallisepticum* v eksponentni fazi rasti (Maniloff in Morowitz, 1972); b) izbočene kolonije *M. hominis* narejene z Nomarski interferenčnim mikroskopom (Embree in Embil, 1980); c) kolonije *M. synoviae* označene s specifičnimi protitelesi v indirektnem imunoperoksidaznem testu (Dušanić, 2012).

Figure 1: Cell and colony morphology in different mycoplasma species. a) Differently shaped cell of *M. gallisepticum* in exponential growth phase (Maniloff and Morowitz, 1972); b) colonies of *M. hominis* under Nomarski interference microscope (Embree and Embil, 1980); c) colonies of *M. synoviae* identified using indirect immunoperoxidase assay (Dušanić, 2012).

Mikoplazme so najmanjši znani prokarionti velikosti od 0,3 do 0,8 μm , ki nimajo celične stene in lahko prehajajo skozi filtre s porami od 0,2 do 0,45 μm . Zavzamejo lahko številne morfološke oblike, najbolj pogoste so sferična, hruškasta in stekleničasta oblika. Na trdnih gojiščih tvorijo tipične kolonije oblike ocvrtega jajca z rahlo izbočeno sredino, kolonije so velike od 0,1 do 1,0 mm. Na površinah lahko tvorijo biofilm, mehanizem, s katerim se lažje zoperstavljajo vplivom okolja. Nekatere vrste se dokazano kemotaktično gibljejo, lahko pa tudi polzijo po površinah. Večinoma so fakultativni anaerobi, ki za življenje ne potrebujejo nujno vira kisika. Kot glavni vir energije privzemajo glukozo ali arginin, za rast pa potrebujejo še NAD in sterole. V *in vitro* kulturi dobro uspevajo na Freyevem mediju, ki vsebuje svinjski serum, glukozo, NAD in druge dodatke za rast (Kleven, 2003).

2.1.3 Življenjsko okolje, gostitelji in povzročanje okužb

Mikoplazme so v naravi zelo razširjene, patogene vrste se pojavljajo kot paraziti ljudi, sesalcev, ptic, plazilcev, rib in členonožcev ter rastlin. Gostiteljsko in tkivno so zelo specifične, kar najverjetneje odraža njihove specifične prehranske zahteve. Vendar raziskovalci poročajo o sekundarni oz. atipični kolonizaciji, tj. izolaciji mikoplazem iz gostiteljev ali organov in tkiv, za katere sicer niso značilne. Npr. kljub temu, da *Mycoplasma fermentans* preferenčno naseljuje sluznico dihal, so jo že večkrat izolirali iz urogenitalnih poti. Primarni habitati človeških in živalskih mikoplazem so mukozne površine dihal in urogenitalnih organov, oči, žrela ter drugih delov prebavil, mlečne žleze ter sklepov (Razin in sod., 1998; Waites in Talkington, 2004).

Pri ljudeh je opisanih okoli 20 vrst, ki naseljujejo mukozne površine organov in organskih sistemov. Večina vrst je prisotna zunaj celic, *M. pneumoniae*, *M. genitalium* in *M. penetrans* pa lahko vstopijo v celice in se znotraj njih razmnožujejo. Nekatere okužbe lahko preidejo v sistemske oblike, predvsem v okužbe sklepov oz. arthritis (Blanchard in Bébáar, 2002).

Pri živalih predstavlja okužbe z mikoplazmami težave predvsem v živilski industriji, kjer povzročajo izgubo produkcije. Tako kot človeške tudi živalske mikoplazme naseljujejo mukozna tkiva dihalnega sistema, mlečne žleze, seroznih membran in urogenitalnih poti. Večinoma gre za kronične (subklinične) oblike bolezni. Terapevtski pristop, npr. uporaba ustreznih antibiotikov, omogoča začasno izboljšanje zdravja živali, je pa veliko težje dokončno odstraniti vir okužbe v velikih jatah ali čredah, saj se nekatere vrste prenašajo med živalmi preko aerosola (Frey, 2002).

2.1.4 Genom

Velikost genoma mikoplazem, ki obstaja v obliki dvostranske krožne molekule DNA, se giblje od 580 kbp za vrsto *Mycoplasma genitalium* do 1358 kbp za vrsto *Mycoplasma penetrans* (Sirand-Pugnet in sod., 2007). Velikost genoma variira tudi med sevi posamezne vrste. Ta variabilnost delno izhaja iz visoke vsebnosti ponavljajočih elementov, npr. IS elementov (angl. insertion sequence) ali odsekov proteinskih genov z različno velikostjo in številom. Ni pa opazne korelacije med velikostjo genoma in sposobnostjo gojenja vrste *in vitro* (Razin in sod., 1998).

Vsebnost G+C baznih parov se giblje od 23 do 40 %, njihova razporeditev po genomu pa je neenakomerna. Višja vsebnost G+C parov izkazujejo regije genov za rRNA, tRNA, ATP sintazo, piruvat dehidrogenazo ter geni, ki kodirajo variabilne površinske proteine, ki so vključeni v imunski odziv. Kljub temu, da imajo genomi različnih vrst mikoplazem skupne značilnosti, pa je njihova splošna organizacija oz. razporeditev genov različna. Primerjave genomov med vrstami kažejo na visoko stopnjo kromosomskih prerazporeditev, ki so še posebej pogoste na lokusih za izražanje površinskih proteinov. Kljub majhnemu genomu mehanizem za variabilno izražanje površinskih molekul omogoča tvorbo novih metabolnih poti ali proteinskih funkcij, ki olajšajo kolonizacijo gostitelja (Sirand-Pugnet in sod., 2007).

Med vrstami mikoplazem je prihajalo tudi do horizontalnega prenosa genov, predvsem je to opazno pri vrstah, ki so filogenetsko bolj oddaljene. Značilen primer so geni za hemaglutinin, nevraminidazo in cisteinsko proteazo, prisotni v genomih *M. gallisepticum* in *M. synoviae*, ki sicer spadata v dve ločeni taksonomski skupini (preglednica 1). Ortologni geni s svojimi produkti sodelujejo v celičnem metabolizmu ali pri patogenezi, nekateri pa še nimajo določene funkcije (Cizelj in sod., 2011).

Ena izmed pomembnih sprememb v genomu mikoplazem je zamenjava kodona UGA, ki v 'univerzalnem' genetskem kodu predstavlja stop kodon, pri mikoplazmah pa kodira aminokislino triptofan. Tako imajo mikoplazme namesto enega kar dva kodona za triptofan (še kodon UGG). Ta lastnost otežuje kloniranje in ekspresijo mikoplazemskih proteinov v tujih gostiteljih, npr. v *Escherichia coli*. V drugih gostiteljih namreč na mestu UGA pride do zaključka prevajanja genov, kar pomeni, da nastanejo nefunkcionalni proteini (Inamine in sod., 1990).

2.1.5 Mehanizmi patogeneze

Mikoplazme aktivirajo imunski sistem gostitelja, vplivajo na aktivacijo makrofagov in indukcijo citokinov, njihove celične komponente delujejo kot superantigeni, kot odziv na okužbo pa pogosto pride do nastanka avtoimunskih reakcij. Preko procesa antigenske variacije površinskih molekul so se sposobne izogibati imunskemu odzivu gostitelja. S pomočjo posebnih proteinov, imenovanih adhezini, se pritrdijo na gostiteljske celice, vanje pa lahko tudi vstopajo (Razin in sod., 1998). Kronične okužbe z mikoplazmami povzročijo, da gostiteljske celice nenehno prejemajo signale, ki spremenijo izražanje genov gostitelja in tako vplivajo na njegove celične procese. Različne študije so pokazale, da kronične okužbe povzročajo genomsko nestabilnost, številne kromosomske spremembe ter maligne

transformacije okuženih sesalskih celic (Lo, 2002). Mikoplazme ob okužbi povišajo ekspresijo genov, katerih produkti sodelujejo v potek apoptoze, povzročijo povišano izločanje dušikovega oksida in citokinov, kar značilno poveča vnetni odziv gostitelja (Dušanić in sod., 2012). Mikoplazme ne vsebujejo znanih potentnih toksinov, poškodbe celičnih membran gostiteljevih celic so navadno posledica vpliva stranskih produktov metabolizma, npr. vodikovega peroksida ali superoksidnih radikalov (Razin in sod., 1998).

2.1.5.1 Vezava na receptorje gostiteljskega tkiva

Za številne mikoplazme velja, da se morajo za uspešno kolonizacijo gostitelja in povzročanje okužbe pritrdirti na celice tarčnega tkiva. Torej je zanje adherenca poglavitni virulenčni mehanizem, saj so sevi, ki niso sposobni pritrjanja, avirulentni. Najbolje je preučen sistem pritrjanja pri *Mycoplasma pneumoniae*, ki povzroča atipično vnetje dihal pri ljudeh. *M. pneumoniae* ima na enem izmed polov posebni pritrditveni organel (angl. tip structure), ki sodeluje pri pritrjanju na celično površino. Organel sestavljata 169 kDa velik protein P1 in manjši, 30 kDa velik protein P30, ki sprožita pri gostitelju močan imunski odziv. Protein P1 se nakopiči na konici pritrditvenega organela, saj je za stabilno stik z receptorskimi molekulami na celici gostitelja potrebna določena koncentracija tega proteina. Primarni površinski receptorji na celicah gostitelja so navadno sialoglikokonjugati. Na človeških eritrocitih je npr. receptor za vezavo *M. pneumoniae* glikoprotein s terminalnim zaporedjem NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc. Se pa lahko mikoplazme vežejo tudi na glikoproteine, ki ne vsebujejo sialične kisline (Rottem, 2003).

2.1.5.2 Invazija v gostiteljske celice

Mikoplazme lahko ostanejo pritrjene na površini celic ali pa vanje vstopijo. Znotrajcelična lokalizacija jim olajša proces izogibanja imunskemu sistemu gostitelja in prepreči delovanje antibiotikov. Zmožnost vstopanja v nefagocitirajoče celice imajo številne vrste, npr. *M. penetrans*, *M. fermentas*, *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. gallisepticum* in *M. synoviae*. Za diferenciacijo med celicami, ki so pritrjene na površino in tistimi, ki vstopajo v celice, se najbolj pogosto uporablja gentamicinski invazijski test. Bakterijska invazija v evkariontske celice je sicer kompleksen pojav sestavljen iz številnih procesov tako na strani bakterije kot tudi na strani gostitelja. V prvi faziji se mora bakterija pritrdirti na površino, vendar to ni zadosten signal za vstop v celice. Čeprav pojav še ni popolnoma pojasnjen, vemo, da je za invazijo potrebna vezava fibronektina ali polisaharidov, ki vsbeujejo sulfatne skupine, saj te spojine tvorijo 'molekularni most' med bakterijo in celico. Kontakt z gostiteljsko celico hkrati povzroči prerazporeditev elementov citoskeleta v

celici, kar olajša vstop patogene bakterije (Dušanić in sod., 2009; Rottem, 2003). Znotraj celice se mikoplazme nahajajo v citoplazmi, lahko tudi tik ob jedru. V ustreznih gostiteljskih celici lahko znotrajcelično preživijo dolga obdobja, lahko pa v celični citoplazmi nanje delujejo fagosomi in lizosomi, ki jih razgradijo (Rottem, 2002).

2.1.5.3 Poglavitni imunogeni proteini mikoplazem

Mikoplazme vsebujejo številne proteine, ki ob stiku z gostiteljem sprožijo imunski odziv. Veliko dejavnikov imunogenosti je še neopisanih in neraziskanih, nekateri pa so že dokazani pri številnih vrstah. Ti med drugim vključujejo encime, molekulske šaperone in lipoproteine. Prav številni lipoproteini, ki se nahajajo na površini celične membrane mikoplazem, veljajo za poglavitev antigene. V literaturi so kot imunogeni opisani faktor elongacije EF-Tu, enolaza, NADH oksidaza, hemaglutinin VlhA, beta veriga ATP sintaze, šaperon DnaK itd. (Benčina, 2002; Berčič in sod., 2008a; Slavec in sod., 2011).

2.1.5.4 Proteazna aktivnost

Možnost, da je patogenost mikoplazem povezana tudi s proteazno aktivnostjo, je bila predlagana že leta 1984 (Gabridge). Bakterijske proteaze imajo pomembno vlogo tudi pri drugih bakterijah, npr. *Streptococcus pyogenes*. Cizelj in sodelavci so dokazali, da *M. synoviae* in *M. gallisepticum* vsebujejo cisteinsko proteazo CysP, ki lahko med drugim cepi kokošje IgG v fragmenta Fab in Fc. Spremembe strukture kokošjih IgG (vezava, cepitev ali desializacija) lahko vpliva na nastanek avtoprotiteles (Berčič in sod., 2011; Cizelj in sod., 2011).

2.1.5.5 Nukleazna aktivnost

Ker imajo mikoplazme omejene metabolne poti, posedujejo encim nukleazo, s katerim lahko pridobijo prekurzorje za sintezo nukleinskih kislin. Poleg tega pa so raziskovalci odkrili, da lahko nukleaze tudi spremenijo metabolizem nukleinskih kislin gostitelja, kar vodi v apoptozo gostiteljskih celic. Najbolj potentno nukleazno aktivnost imata *M. fermentans* in *M. penetrans*. Pri *M. penetrans* je nukleaza 40 kDa velik polipeptid, ki za optimalno delovanje potrebuje Mg²⁺ in Ca²⁺ ione (Blanchard in Bébári, 2002; Bolha, 2010).

2.1.5.6 Mehanizmi izogibanja imunskemu odzivu gostitelja

Če želijo mikoplazme preživeti in se razmnoževati znotraj gostitelja, morajo znati zaobiti imunski odziv gostitelja. Mehanizmi, kot so molekularna mimikrija ali variacija površinskih antigenov omogočajo, da gostitelj ne prepozna tujka (Rottem, 2003). Kot to velja za vse patogene mikroorganizme, tudi površina mikoplazemske celice odraža njene interakcije z gostiteljem, njegovimi celicami in imunskim sistemom. Za mikoplazme pa je posebno, da te številne funkcije izhajajo iz zelo omejenega seta genov. Sistemi, ki omogočajo mutacije površinskih molekul, so pravzaprav del strategije prilagajanja, ki olajša preživetje mikoplazem v gostitelju. V teh sistemih prihaja do mutacij v zaporedjih, ki se strateško nahajajo v pomembnih genih. Tipičen primer takšnega sistema je družina psevdogenov *vlhA*, ki omogočajo pretvorbe genov in tvorbo 'himernih' lipoproteinov hemaglutininov (Slavec in sod., 2011; Yoge in sod., 2002).

2.1.5.7 Modulacija imunskega sistema

Ob stiku gostitelja z mikoplazmo se sproži vrsta obrambnih mehanizmov. Ti vključujejo nastanek specifičnih protiteles različnih razredov proti antigenom mikoplazem, stimulacijo humoralne imunosti, opsonizacijo in fagocitozo itd. (Razin in sod., 1998). Mikoplazme se pred temi procesi branijo z enim od svojih poglavitnih virulenčnih mehanizmov – indukcijo izločanja citokinov. Ti imajo številne vplive na evkariontske celice. Srečanje mikoplazme z mononuklearnimi in polimorfonuklearnimi fagociti sproži sintezo citokinov in kemokinov ter ima provnetne učinke na tkivo. Najpogosteje pride do izločanja citokinov TNF- α , IL-1 in IL-6, kemokinov IL-8, MCP-1, MIP-1 α , GM-CSF, prostaglandinov in dušikovega oksida. Te molekule vplivajo na povišano ekspresijo MHC I in MHC II molekul. Nekatere mikoplazme izločajo tudi superantigene, to so proteini, ki so potentni imunoregulatorji in lahko aktivirajo veliko število limfocitov T, kar posledično vodi v močan vnetni odziv. Zelo dobro je bil preučen superantigen *Mycoplasma arthritidis*, imenovan MAM (Dušanić, 2012; Rottem, 2003). Drugi imunomodulatorni vplivi so: zaviranje ali poliklonalna stimulacija tvorbe B in T limfocitov, povišanje citotoksičnosti makrofagov, celic naravnih ubijalk in celic T, povečanje izražanja celičnih receptorjev in aktivacija kaskade komplementa. Vsi ti mehanizmi pripomorejo k izogibanju ali zaviranju delovanja imunskega sistema in omogočajo vzpostavitev kroničnih okužb (Razin in sod., 1998).

2.2 PASJE MIKOPLAZME

Termin pasje mikoplazme v najbolj širokem pomenu zajema vse vrste mikoplazem, ki so jih kadarkoli izolirali iz psov. Nekatere med njimi okužujejo tudi druge gostitelje, npr. mačke, govedo, človeka. Določene vrste so pri psih tudi del normalne mikroflore, kot npr. *Mycoplasma cynos*. Detekcija v kliničnih vzorcih je osnovana na principu potrditve prisotnosti ali odsotnosti okužbe s klasičnimi metodami (gojenje na gojiščih za mikoplazme, pregled pod mikroskopom ali serološke analize) ali preko analiz zaporedij genov za 16S rRNA z metodo verižne reakcije s polimerazo (Chalker, 2005).

Preglednica 2: Vrste pasjih mikoplazem in nekatere njihove značilnosti (prirejeno po Chalker, 2005).

Table 2: Canine mycoplasma species and their main features (after Chalker, 2005).

Vrsta	Tipski sev	Poglavitni gostitelj(i)	Značilnosti genoma		Biokemijske lastnosti		
			G+C bp	Velikost [kbp]	G	A	F
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	PG8	Različni	31-36	1625-1650	+	-	-
<i>Mycoplasma arginini</i>	G230	Pes, koza, mačka, ovca	27,6-28,6	735	-	+	-
<i>Mycoplasma bovigenitalium</i>	PG11	Krava, pes	28,1-30,4	606	-	-	+
<i>Mycoplasma canis</i>	PG14	Krava, pes, človek	28,4-29,1	795	+	-	-
<i>Mycoplasma cynos</i>	H831	Pes	25,8	960-1010	+	-	+
<i>Mycoplasma edwardii</i>	PG24	Pes	29,2	980	+	-	-
<i>Mycoplasma feliminutum</i>	Ben	Pes, mačka	29,1	NP	+	-	-
<i>Mycoplasma felis</i>	CO	Pes, konj, mačka, človek	25,2	1055	+	-	+
<i>Mycoplasma gateae</i>	CS	Pes, mačka	28,5	667	-	+	-
<i>Mycoplasma maculosum</i>	PG15	Pes	26,7-29,6	1034	-	+	+
<i>Mycoplasma molare</i>	H542	Pes	26,0	880-897	+	-	-
<i>Mycoplasma mucosicanis</i>							
<i>Mycoplasma opalescens</i>	MH5408	Pes	29,2	NP	-	+	+
<i>Mycoplasma spumans</i>	PG13	Pes	28,4-29,1	NP	-	+	+
<i>Mycoplasma</i> sp. sev HRC 689	HRC 689	Pes	23,8	968	+	-	+
<i>Mycoplasma</i> sp. sev VJC 358	VJC 358	Pes	NP	NP	+	-	NP
<i>Ureaplasma canigentialium</i>	D6P-C	Pes	28,7	860	-	-	-

Zaradi kompleksnih prehranskih potreb (preglednica 2) je mikoplazme težko gojiti v pogojih *in vitro*, kar je tudi poglavitni razlog, da nekatere vrste še niso bile uspešno gojene

v kulturi, njihov obstoj pa je bil potrjen na podlagi prisotnosti genov za 16S rRNA (Chalker, 2005). Najpogosteje sta v kliničnih vzorcih psov prisotni *Mycoplasma canis*, ki povzroča vnetja urogenitalnih poti in encefalitis, ter *Mycoplasma cynos*, ki povzroča pljučnico in podobne okužbe dihal (Chalker in sod., 2004; May in Brown, 2009; Rycroft in sod., 2007).

2.2.1 Identifikacija vrst

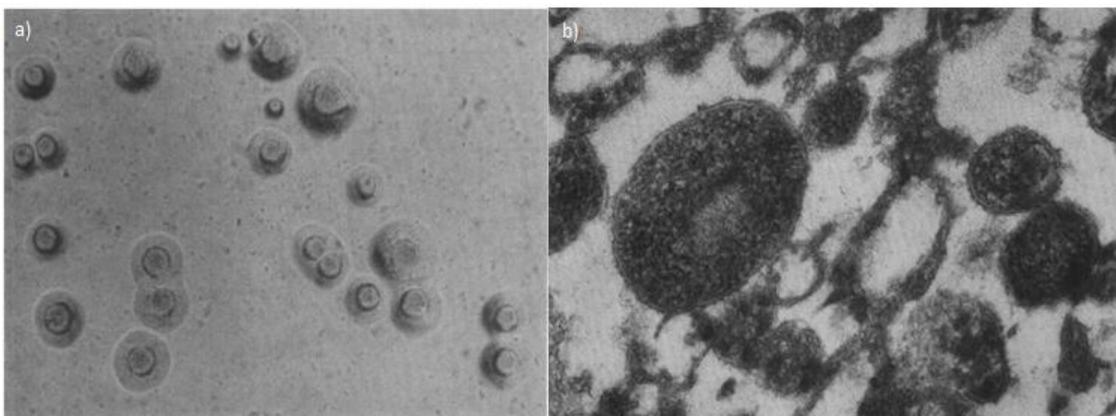
Večino pasjih mikoplazem po izolaciji lahko gojimo na medijih za gojenje mikoplazem v aerobni kulturi na 37°C. Kultivacija mikoplazem *in vitro* zaenkrat še ostaja poglavitna metoda detekcije njihove prisotnosti v kliničnih vzorcih po principu potrditve prisotnosti ali odsotnosti okužbe. Kolonije so vidne pod svetlobnim mikroskopom in na trdnih gojiščih najpogosteje zavzamejo tipično morfološko obliko ovrtega jajca, ki je značilna tudi za številne druge mikoplazme. Vendar zgolj na podlagi morfologije kolonij ni mogoče določiti posamezne vrste pasje mikoplazme, kar je še najbolj opazno pri mešanih okužbah vzorcev. Tradicionalno se je identifikacija opravljala na podlagi seroloških metod, pri katerih potrebujemo za vsako posamezno vrsto specifičen protiserum. Uspešno se za identifikacijo vrst uporablja tudi metode inhibicije rasti, imunofluorescence, inhibicije metabolizma in dvojne imunodifuzije, pri katerih seveda lahko prihaja do navzkrižnih reakcij. Vrste lahko ločujemo še na podlagi biokemijskega profila, kjer določamo stopnjo fermentacije glukoze, hidrolize arginina in proizvodnje fosfataze. Velik napredek v zmožnosti identifikacije posameznih vrst in sevov predstavlja uvedba molekularnih tehnik analize zaporedij genov za 16S rRNA. *Mycoplasma haemocanis*, na primer, ni bila nikoli izolirana in gojena v kulturi, s pomočjo PCR analiz genov za 16S rRNA pa so potrdili njen prisotnost v kliničnih vzorcih (Chalker, 2005). Chalker in sodelavci so v študiji z analizo PCR testirali 108 vzorcev DNA iz pasjega pljučnega tkiva, pri katerih je bilo 15 % vzorcev pozitivnih za prisotnost mikoplazem, kljub temu da z gojenjem istih vzorcev *in vitro* niso zabeležili rast kolonij (Chalker in sod., 2002). Za identifikacijo in potrditev vrste je torej bistvena uporaba več laboratorijskih tehnik hkrati.

2.2.2 Obolenja, ki jih povzročajo pasje mikoplazme

Zaradi težav pri identifikaciji posameznih vrst pasjih mikoplazem je bolj malo znanega o specifičnih obolenjih, ki jih le-te povzročajo pri psih. Psi so možnosti okužbe izpostavljeni že ob prehodu skozi porodni kanal. Mehanizmi patogenosti pasjih mikoplazem in narava imunskega odziva gostitelja v večini primerov še niso pojasnjeni (Chalker, 2005).

2.2.3 Dihalne poti in *Mycoplasma cynos*

Mikoplazme so v zgornjih dihalnih poteh prisotne pri vseh psih, kar pomeni, da so najverjetnejše del normalne bakterijske flore, niso pa normalno prisotne v sapniku in pljučih. Kolonizacija pljučnega tkiva je posledica okužbe, ki se na zunaj kaže kot pljučnica in spremljajoče septično vnetje (Rosendal, 1982). Najbolj pogosto je z okužbami dihal povezana *Mycoplasma cynos*, ki je bila kot vrsta prvič opisana leta 1973 (Rosendal). Pri eksperimentalni okužbi z *M. cynos* je opazna pljučnica, izguba ali uničenje cilijev na površini tkiv ter infiltracija nevtrofilcev in makrofagov v pljučne alveole (Chalker, 2005). Okužbi z *M. cynos* so bolj izpostavljene mlade živali, najpogosteje je izolirana iz psov, ki so stari manj kot leto dni. Študije nakazujejo, da se *M. cynos* lahko prenaša tudi po zraku (aerosol), pojav pogost med živalmi, ki živijo tesno skupaj – v zavetiščih (Chalker in sod., 2004).



Slika 2: *Mycoplasma cynos* H831. a) Slika neobarvanih kolonij *M. cynos* s tipično morfologijo ocvrtega jajca pod stereo mikroskopom; b) Celice *M. cynos* pod elektronskim mikroskopom (Rosendal, 1973).

Figure 2: *Mycoplasma cynos* H831. a) Stereo microscope photograph of *M. cynos* unstained colonies displaying typical fried-egg cell morphology; b) Cells of *M. cynos* under electron microscope (Rosendal, 1973).

2.2.4 Urogenitalne poti in *Mycoplasma canis*

Tudi okužbe urogenitalnih poti, ki so sicer bolj pogoste pri psicah, so povezane s prisotnostjo mikoplazem (Chalker, 2005). O prvi izolaciji mikoplazem iz urogenitalnih organov so poročali že leta 1951. Tako kot to velja za dihala, so mikoplazme pogosto del normalne bakterijske flore nižjih delov sečil in rodil (Edward in Fitzgerald, 1951). Najpogosteje izolirana bakterija je *Mycoplasma canis*, ki jo najdemo pri živalih, ki trpijo za različnimi boleznimi rodil in sečil ter so neplodne. *M. canis* je oportunistična patogena bakterija, ki so jo izolirali tudi iz drugih sesalskih vrst (May in Brown, 2009). Kulture

M. canis so izolirali iz prostate, obmodka, nožnice in stene kronično vnetega mehurja. Eksperimentalna okužba z *M. canis* pri psih povzroča vnetje sečnice in mod, pri psicah pa vnetje endometrija (Chalker, 2005).

2.2.5 Anemija

Akutno okužbo z *Mycoplasma haemocanis*, ki so jo po izsledkih analize genov za 16S rRNA iz rodu *Haemobartonella* prestavili v rod *Mycoplasma*, spremlja hitro razvijajoča anemija. Celice *M. haemocanis* se pritrjajo na površino eritrocitov. Akutna oblika anemije se pojavlja skupaj s simptomi zaspanosti, otrplosti, izgube teže, vročine in celo anoreksije (Chalker, 2005).

2.2.6 Zdravljenje

Zaradi odsotnosti celične stene, so mikoplazme odporne na β -laktamske antibiotike, podaljšana terapija s temi antibiotiki pa lahko okužbo celo poslabša. Na večino pasjih mikoplazem med drugim delujeta doksiciklin in tetraciklin, ki inhibirata proteinsko sintezo (Chalker, 2005).

2.3 VIRULENČNI DEJAVNIKI PASJIH MIKOPLAZEM

O patogenezi in povezanih virulenčnih dejavnikih pasjih mikoplazem ni veliko podatkov. Nekatere vrste lahko na krvnem agarju povzročajo hemolizo, kar nakazuje na izločanje hemolitičnih encimov. Prisotni so vrstno specifični antigeni, na katere se ne vežejo protitelesa proti drugim vrstam mikoplazem (Chalker, 2005; Sayed in Hatten, 1976). Pasje mikoplazme *M. canis*, *M. cynos* in *M. molare* imajo nevraminidaze, ki bi lahko omogočale desializacijo pasjih glikoproteinov (May in Brown, 2009). *M. canis* in *M. cynos* posedujeta tudi nukleaze, ki povzročajo poškodbe nukleinskih kislin gostitelja (Bolha, 2010). *M. canis* in *M. cynos* sintetizirata hemaglutinine, ki so eni izmed imunodominantnih proteinov za okužene pse (Kastelic in sod., 2015; Benčina, neobjavljeni podatki). Rycroft in sodelavci (2007) poročajo še o 45 kDa velikem imunodominantnem proteinu pri *M. cynos*, na katerega so se vezala protitelesa pasjih serumov.

2.3.1 Nevraminidaza (sialidaza) in sialične kisline

Sialične kisline združujejo družino približno štiridesetih derivatov nevraminske kisline. Njihova variabilnost se kaže v raznolikosti kemijskih struktur in lokaciji na celicah. Pri sesalcih in ptičih so sialoglikokonjugati prisotni na celični površini, znotrajceličnih membranah (npr. v Golgijevem aparatu) ali pa kot komponente seruma in mukoznih izločkov. Sialična kislina je vezana preko C2 ogljika na poziciji 3 ali 6 predzadnjega sladkorja glikoproteinov ali redkeje na poziciji 8 druge sialične kisline (Traving in Schauer, 1998). Sodelujejo v procesih medceličnega prepoznavanja, signalizacije in vezave. Njihov negativni naboj omogoča vezavo in transport pozitivno nabitih molekul (npr. Ca^{2+}). Ker so površinsko izpostavljene delujejo kot zaščitni sloj, ki preprečuje encimatsko razgradnjo glikoproteinov ali samih celic in pri okužbah bakterijam omejujejo kolonizacijo tkiva. Na podlagi vzorca sializiranosti imunski sistem ločuje med lastnimi in tujimi molekulami (npr. sializirani sladkorji kot antigenske determinante krvnih skupin). Patogeni mikroorganizmi načeloma niso sposobni sinteze sialičnih kislin, vendar jih nekateri lahko privzamejo od gostitelja, z njimi prekrijejo svojo površino in se na tak način izmikajo imunskemu odzivu. S sialično kislino prekriti receptorji predstavljajo vezna mesta na gostiteljevih celicah, na katera se lahko vežejo virusi, bakterije in praživali (Severi in sod., 2007; Vimr in Lichtensteiger, 2002).

Sialidaze ali nevraminidaze (EC 3.2.1.18) so virulenčni dejavniki številnih patogenih mikroorganizmov. Med drugim jih najdemo tudi pri nekaterih mikoplazah: *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. neurolyticum*, *M. corogypsi*, *M. meleagridis*, *M. anseris*, *M. canis*, *M. cynos*, *M. molare* in *M. alligatoris*. Nivo nevraminidazne aktivnosti se lahko razlikuje med sevi iste vrste, kot je bilo dokazano za *M. neurolyticum* (Berčič in sod., 2008b, 2012) in za različne seve *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. canis* in *M. cynos* (Berčič in sod., 2011; May in Brown, 2009; May in sod., 2007). Sialidaze, ki so po naravi delovanja eksoglukozidaze, so glavni encimi v katabolizmu sialičnih kislin. Hidrolizirajo glikozidno vez med sialično kislino in sladkorjem, na katerega je ta vezana v ogljikohidratnih verigah oligosaharidov ali glikokonjugatov. Ker podobno kot drugi mikroorganizmi tudi mikoplazme same ne proizvajajo sialičnih kislin, imajo pa nevraminidazo, se postavlja vprašanje, kakšna je njena biološka vloga. Raziskovalci so med drugim prisotnost nevraminidaze povezali z zmožnostjo okuževanja gostitelja in ugotovili, da ima encim pomembno vlogo pri patogenezi (Traving in Schauer, 1998).

Pri mikoplazmah se genski zapis za sintezo nevraminidaze nahaja v genih *nan* (Berčič in sod., 2008b). Najbolj ohranjen motiv v zaporedju je t.i. Asp škatla (angl. Asp box), to je zaporedje aminokislin s splošno formulo -S-X-D-X-G-X-T-W-, pri čemer je lahko X katerikoli aminokislinski ostanek. Motiv se lahko ponovi štiri- do petkrat. Drugi pomembni motiv v aminokislinskem zaporedju je motiv RIP (X-R-X-P), pri katerem sta ohranjeni aminokislini arginin in prolin. Nahaja se na N-terminalnem delu molekule, zaradi sposobnosti vezave molekule substrata na argininski ostanek pa predstavlja del aktivnega mesta encima (Roggentin in sod., 1989). Ker imajo ozko sorodne vrste in celo različni sevi znotraj iste vrste različne sposobnosti sinteze nevraminidaze, so raziskovalci sklepalni, da njena prisotnost ni nujno potrebna za preživetje, predstavlja pa prednost v tekmovanju za hranila in za uspešno kolonizacijo gostitelja (Grobe in sod., 1998).

Sialidaze kot virulenčni dejavniki sodelujejo pri pospeševanju mikrobne kolonizacije, invazije tkiva in poškodbah sializiranih molekul, celičnih površin ter izvenceličnega matriksa gostitelja (Severi in sod., 2007). Delujejo kot razširitveni dejavnik, saj omogočajo nemoteno razmnoževanje bakterije in posledično invazijo gostiteljskega tkiva. Visoka koncentracija sialidaz inaktivira nekatere encime, hormone in serumske glikoproteine (Traving in Schauer, 1998). Sialidazna aktivnost je pri mikoplazmah prisotna le pri nekaterih vrstah, ki okužujejo ptice, pse, glodalce in aligatorje (Berčič in sod., 2008a; May in sod., 2007). Sialidaza *M. alligatoris* povzroča apoptozo gostiteljevih celic (Hunt in Brown, 2007), NanH, nevraminidaza *M. synoviae*, pa desializira kokošje glikoproteine, tudi težke verige IgG molekul (Berčič in sod., 2011). Med pasjimi mikoplazmami imajo najizrazitejšo nevraminidazno aktivnost *M. canis*, *M. cynos* in *M. molare* (Berčič in sod., 2012).

Terminalno vezana sialična kislina sicer ščiti molekule, na katere je vezana, pred hidrolizo, po odcepitvi z nevraminidazo pa postanejo te molekule tarče za nadaljnjo encimsko razgradnjo. Poveča se prepustnost vezivnega tkiva, zmanjša se viskoznost telesnih tekočin (npr. sluznice dihal). Vsi ti procesi olajšajo širjenje mikroorganizmov in omogočajo dostop do celic oz. tesnejši stik s celicami gostitelja. Zaradi depolimerizacije izvenceličnega matriksa ta ne deluje več kot rezervoar citokinov in encimov, ki so pomembno vpleteni v prenos signalov in sprožitev imunskega odziva (Baum in Paulson, 1990; Ito in sod., 1997; King in sod., 2006; Ponnuraj in Jedrzejas, 2000; Schauer in sod., 1984).

Pri mikoplazmah je zanimiva tudi specifika desializacije glikoproteinov gostitelja. Sialična kislina je v glikoproteinih pri ljudeh in živalih navadno vezana na galaktozo z $\alpha(2-3)$ ali $\alpha(2-6)$, redkeje tudi z $\alpha(2-8)$ glikozidno vezjo (Roggentin in sod., 1993). Nevraminidaza *M. synoviae* desializira fetuin in transferin ter številne kokošje serumske glikoproteine (tudi težke verige IgG) z odcepitvijo sialične kisline, ki je vezana preko $\alpha(2-6)$ glikozidne vezi. Ravno tako desializira glikoproteine sluzi sapnika in odceplja sialično kislino, ki je na glikoproteine vezana z $\alpha(2-3)$ glikozidno vezjo (Berčič in sod., 2011). Predhodne raziskave nakazujejo, da *M. canis* bolje odcepi sialično kislino, ki je na galaktozo vezana preko $\alpha(2-3)$ glikozidne vezi (Benčina, neobjavljeni podatki). Patogene pasje mikoplazme *M. canis*, *M. cynos* in tudi *M. molare* sintetizirajo relativno veliko nevraminidaze, katere znatne količine se sprostijo z njihovih celic v gojišče v katerem rastejo (May in Brown, 2009). Če se to dogaja *in vivo* morda pride do močne desializacije receptorjev na gostiteljevih celicah, kar olajša vzpostavitev okužbe. Pri sevih *M. canis* gen za sialidazo kodira protein s 1137 aminokislinami in teoretično molekulsko maso 130 kDa (Brown in sod., 2012). Ta ustreza molekulski masi, ki so jo za proteina *M. canis* Larissa in PG14^T (~ 131 kDa) z nevraminidazno aktivnostjo določili Berčič in sodelavci (2012). Prav tako so identificirali nevraminidazi *M. cynos* (105 kDa) in *M. molare* (110 kDa).

2.3.2 Hemagglutinin

Hemaglutinini so visoko imunogeni površinski lipoproteini, ki povzročajo hemaglutinacijo (zlepljanje) eritrocitov oz. njihovo vezavo na kolonije mikoplazem (hemadsorpcija). Kljub obsežni redukciji genskega materiala in posledično omejeni sposobnosti biosinteze mikoplazme posedujejo mehanizme za variabilno ekspresijo površinskih antigenov, tudi hemaglutininov. Čeprav se na prvi pogled to zdi energetsko potratno, pa je ravno sposobnost spremjanja površinsko izpostavljenih antigenov ključnega pomena za preživetje v imunokompetentnem gostitelju. Patogene vrste ptičjih mikoplazem *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis* in *M. iowae* sintetizirajo hemaglutinine, pri pasjih mikoplazmah pa ti še niso bili identificirani (Abdelmoumen Mardassi in sod., 2007; Benčina, 2002; Noormohammadi in sod., 2000).

Hemaglutinini genske družine pMGA *M. gallisepticum* in gena *vlhA* *M. synoviae* so tipičen predstavnik variabilno izraženih površinskih imunogenih lipoproteinov (Benčina, 2002; Slavec in sod., 2011). Hemaglutinacijsko pozitiven fenotip *M. synoviae* je povzročil vnetje sklepov pri večjem odstotku kokoši kot hemaglutinacijsko negativen fenotip (Narat in sod., 1998). Lavrič in sodelavci (2007) so dokazali, da MSPB (N-terminalni del hemaglutinina

VlhA *M. synoviae*) aktivirajo izločanje dušikovega oksida ter citokinov IL-6 in IL-1 β pri kokošjih makrofagih.

Kolonije *M. canis* in *M. cynos* vežejo eritrocite (Tully, 1983). Manchee in Taylor-Robinson (1969) sta pokazala, da predhodno tretiranje (človeških) eritrocitov z nevraminidazo reducira število receptorjev preko katerih se ti vežejo na kolonije *M. canis* PG14^T.

3 MATERIALI IN METODE

Potek raziskav in uporabljene metode dela so shematsko predstavljene v prilogi A.

3.1 VRSTE IN SEVI MIKOPLAZEM

V raziskavi smo uporabili 11 sevov *M. canis*, 18 sevov *M. cynos*, 1 sev *M. molare* in 1 sev *M. edwardii* (preglednica 3). Seve *M. canis* PG 14^T, UF G1, UF G4, UF 31, UF 33 in LV smo dobili iz zbirke mikoplazem iz ZDA (dr. Daniel R. Brown, University of Florida, The Mollicutes Collection of Cultures and Antisera). Seve *M. cynos* H831^T, 1046, 1049, 2296, 2297, 248, 1334, 1478, 2002, 2117, 2155, 2253, 2651 in 2716 smo prejeli od dr. Joachim Spergserja (Veterinärmedizinische Universität Wien, Avstrija). Seva *M. cynos* 316 in 167500 nam je poslala dr. Inna Lysnyansky (Kimron Veterinary Institute, Izrael). Preostale kulture so bile dostopne kot del zbirke Laboratorija za mikoplazme (dr. Dušan Benčina, Oddelek za Zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani).

Seve *M. canis*, *M. cynos*, *M. molare* in *M. edwardii* smo gojili v tekočem in trdnem gojišču za mikoplazme, ki je vsebovalo 10-% konjski serum. Mikoplazme smo gojili pri 37-38°C, za potrebe poskusov smo zbrali celične pelete v pozni logaritemski fazi rasti (cca. 1×10^9 celic ml^{-1}).

V preglednici 3 so prikazani sevi pasjih mikoplazem, ki smo jih uporabili v naših raziskavah in mesta, iz katerih so bili izolirani.

3.1.1 Gojišča za gojenje mikoplazem

3.1.1.1 Tekoče gojišče za mikoplazme

11,25 g Bacto PPLO Broth Base (Difco, ZDA) smo raztopili v 440 ml Milli-Q vode. Raztopino smo 15 minut avtoklavirali pri 121 °C ter ohladili na 45 °C. Dodali smo 50 ml konjskega seruma (Gibco, ZDA), 10 ml 50-% raztopine glukoze (Kemika, Hrvaška), 125 µl 100-kratne BME vitaminske mešanice (B6891, Sigma, ZDA), 400000 IE ampicilina (Sigma, ZDA) in 2,5 ml 0,6-% raztopine barvila fenol rdeče (Merck, Nemčija). pH gojišča smo uravnali na 7,8 z 1 M NaOH (Fluka, ZDA) ter ga sterilizirali s filtracijo. Za namnožitev kulture smo v ustrezenu volumen gojišča dodali 1 % zamrznjene tekoče kulture ali blok agarja s kolonijami mikoplazem velikosti 0,5 x 1,0 cm.

Preglednica 3: Seznam uporabljenih vrst in sevov mikoplazem.

Table 3: List of *Mycoplasma* species and strains used in this research.

Vrsta	Sev	Mesto izolacije/bolezen	Država	Referenca
<i>M. canis</i>	PG14 ^T -a	grlo/NP ^a	Anglija ^b	Berčič in sod., 2012
	PG14 ^T -b	grlo/NP ^a	ZDA ^b	May in Brown, 2009
	UF G1	možgani/meningoencefalitis	ZDA	Brown in sod., 2012
	UF G4	možgani/meningoencefalitis	ZDA	Brown in sod., 2012
	UF 31	genitalni trakt/slabo plodna psica	ZDA	Brown in sod., 2012
	UF 33	genitalni trakt/NP ^a	ZDA	Brown in sod., 2012
	LV	vagina/NP ^a	ZDA	May in Brown, 2009
	Larissa	vagina/vnetje	Slovenija	Berčič, 2009
	Luna	vagina/vnetje	Slovenija	Berčič in sod., 2012
	B16/08	vagina/NP ^a	Anglija	Bradbury (donacija) ^e
<i>M. cynos</i>	155547	vagina/NP ^a	Izrael	Lysnyansky (donacija) ^f
	H831 ^T	pljuča/pljučnica	Danska	Rosendal, 1973
	896	pljuča/pljučnica	Avstrija	Zeugswetter in sod., 2007
	105	pljuča/pljučnica	Avstrija	Chvala in sod., 2007
	248	seme/zdrav	Avstrija	Kastelic in sod., 2015
	2296	vagina/CIRD ^d	Avstrija	Kastelic in sod., 2015
	2297	BAL ^c /CIRD ^d	Avstrija	Kastelic in sod., 2015
	1046	prostata/prostatitis	Avstrija	Kastelic in sod., 2015
	1049	mehur/cistitis	Avstrija	Kastelic in sod., 2015
	1334	prostata/prostatitis	Avstrija	Kastelic in sod., 2015
	1478	BAL ^c /CIRD ^d	Avstrija	Kastelic in sod., 2015
	2002	seme/zdrav	Avstrija	Kastelic in sod., 2015
	2117	mehur/cistitis	Avstrija	Kastelic in sod., 2015
	2155	BAL ^c /CIRD ^d	Avstrija	Kastelic in sod., 2015
	2253	seme/azospermija	Avstrija	Kastelic in sod., 2015
	2651	BAL ^c /CIRD ^d	Avstrija	Kastelic in sod., 2015
	2716	vagina/smrt zarodka <i>in utero</i>	Avstrija	Kastelic in sod., 2015
<i>M. molare</i>	316	nosna votlina/NP ^a	Izrael	Kastelic in sod., 2015
	167500	pljuča/pljučnica	Izrael	Kastelic in sod., 2015
<i>M. edwardii</i>	PG-24 ^T	grlo/NP ^a	ZDA	Tully in sod., 1970

^aNP = ni podatka

^b Seva PG14^T prejeta iz Anglije (a) in ZDA (b); sev je bil originalno izoliran iz grla zdravega psa (Edward in Fitzgerald, 1951)

^c BAL = bronhoalveolarni izpirek (angl. bronchoalveolar lavage)

^d CIRD = pasja respiratorna okužba (angl. canine infectious respiratory disease)

^e Donirala dr. Janet M. Bradbury, University of Liverpool, Anglija

^f Donirala dr. Inna Lysnyansky, Kimron Veterinary Institute, Izrael

3.1.1.2 Agarsko gojišče za mikoplazme

2,82 g Bacto PPLO Broth Agar in 0,30 g Noble Agar (241210 in 014201, Difco, ZDA) smo raztopili v 110 ml Milli-Q vode in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Raztopino smo ohladili na 45 °C ter dodali 15 ml konjskega seruma, 2,5 ml 50-% raztopine glukoze, 33 µl 100-kratne BME vitaminske mešanice, 100000 IE ampicilina. Gojišče smo razlili na sterilne plošče, ki smo jih pustili na sobni temperaturi v laminarju, dokler se agar ni ohladil in strdil. Na agar smo s sterilno ezo razmazali do 1 ml tekoče kulture mikoplazem v logaritemski fazi rasti.

3.1.1.3 Tekoče gojišče brez proteinov z večjo molekulsko maso

Tekoče gojišče smo ultrafiltrirali z napravo Amicon stirred cell (model 8200, Millipore, ZDA). Uporabili smo membrano, ki iz medija odstrani vse proteine večje od 10 kDa. Dobljeni filtrat brez proteinov velikih molekulskih mas smo še dodatno sterilizirali s filtracijo skozi 0,45 µm filter. V tako pripravljene gojišču smo gojili celice mikoplazem kot je opisano v točkah 3.5.4 in 3.5.5.

3.2 IZOLACIJA IN ANALIZE NUKLEINSKIH KISLIN

3.2.1 Začetni oligonukleotidi

V preglednicah 4 in 5 so prikazani pari začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za pomnožitev tarčnih genov *M. canis* in *M. cynos*. Začetne oligonukleotide smo izbrali s pomočjo spletnih orodij PrimerQuest Tool in OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, ZDA) na podlagi nukleotidnih zaporedij, dostopnih v podatkovni bazi GenBank (Benson in sod., 2015). Po naših navodilih so nam začetne oligonukleotide sintetizirali pri Kemomedu, Slovenija. Oznaka F (angl. forward) v imenu se nanaša na smiselno (angl. sense) orientacijo, oznaka R (angl. reverse) pa na protismiselno (angl. antisense) orientacijo. Vsi tarčni geni so bili pomnoženi tako, da so zajemali tudi del intergene regije pred in za danim genom (ni prikazano v poravnavah).

3.2.1.1 Pomnoževanje tarčnih genov *M. canis*

Na podlagi znanega zaporedja gena za nevraminidazo *M. canis* PG14^T (NCBI MCANPG14_00438, *M. canis* PG14 Contig 03, AJFQ01000003.1, lega genskega zaporedja 17839 do 21252 bp; Brown in sod., 2012) smo izbrali 5 parov začetnih

oligonukleotidov (pri parih 1 in 5 smo oblikovali en dodatni F oz. R začetni oligonukleotid, ki sta postavljena v intergeno regijo). S pomočjo izbranih parov začetnih oligonukleotidov smo pomnožili gen za nevraminidazo pri različnih sevih *M. canis*. Lega izbranih začetnih oligonukleotidov je prikazana na sliki 3.

```

ATAGGGAAAATAGGTATGTCATTATTAGTCTTCCACTACTCTGATAACTGTTTTAGGAGTTAAATTAGATAGTTATTGTAATTAA
TGTTTCATCATATTCTCCATTATTTTATTGTTACTAATT[GCTATTGAGCATGA AAAAACC]AAAAAGAAGACTGAGATAAAGA Ca_Neu 1aF
TGTAAGAGATAGAATTITAAGCATTITTCATGATAAGCCTCTTAAATTTGAAATTATAAGAATTITATGTTAAGAATTITATGTTCTT
TTTGATAAAAATATGAAATTATAAAAGTTATCAACTAAAGAAAATTTAGATAAAATTAT[ATG]AAAAAAATATAAAAGAATTT
AGCTGTATCTCTTACAGGAGCACTTAAACATGACTCTT[AGCAATATTTCTATGCAATAGTCAAAAGATGAGAAAAGAGAA Ca_Neu 1bF
GAGCAATTCTTCTGAGTCAAATTAAATGTTTGAATTAACATCCCTGAAAAAGATAACTTTGTTCTCAACAAATAACCATAACGAA
CTTATGAGAACCTGAAAGGAGTGTCAAATTAACTAATGTTTGAATTAACATCCCTGAAAAAGATAACTTTGTTCTCAACAAATAACGAA
GAAGGACTAACTTTATCAGAACTCAAGGAAATTGAACTTGAGGACAACAATAAAATTTAGTGTGTTAGATAAGTTAAATCAATAA
CGAGAACAGGAAGTTTTTGATACTAGTGTCAAATAAGAAGTCAATGTCAGAACAACTTAAATGATCAATTAAATTTAA
ATGATAACGACATGATGATGCTCAGAGAAATTCTTCTTCAACATCCCTCAAACTTATGTTAGATTCAGGAACTAGTGCAGTAGGATTATGAAAT Ca_Neu 1R
CAAATGAAATTCTAGGCCACTATTGAAATAGGTTAAACCTCAAGATAATAAAAGAAATTCTTCAAAAGATGTCAGTATCCCCTTCTGTCATAC
AAAACAAATTTCTAAAAACTATCTTAAATAACTGTTTAAATAAAACAGAACAAATACTTATAACAGTAAATTAAATTTAAATAA
CATGGGGAGTCATATTGAGGAAATTATTAGTAACTACATGTTATAACATCAATAAAACTTATAACAGTAAATTAAATTTAAATAA
GACTTTAACAAATCAAATAAA[GAAACAGCAATGTAATACACAG]ATTCAGAAACATTGTTAAATAAACTCTAAATTGAGGT Ca_Neu 3F
TATTGGTGAATGAAAGGATCCATTGAAAATGATCAAATTAATCTACTAAGTGTGTTTGGATAAAAGAAAATTGATT
TTCTAAAAATTAAGAAAATCTAAAAACTTCTTCAAGTCTGGTGC[GAAAGAAATGAGCTTACGCT]CAAAATAAGTTATGACCCAAAT Ca_Neu 2R
GAAAATAACGCTTCTTGTGAGATAAACTTAACTAGTTGACCAATTATTTAAAGAAATACAAAGTAAATAATGAAACAGACAGTT
TGAGACTAGATAACTAATGTTGATAAAACTAATTTGAAATTCGATTCTAAATCGCTTGAAGTGTGATTGATAAACTTCAAGATCATG
AGAGCTTC TTATACCCGGAGTGTAGTTTAAATTAAATAAAATTTGAAATGAAAGGAAATACTTAAAGGTTACTTGTACCAATTAAAC
GAAAGATGATTATCGGAATCCAAGAAATTCAATAAAAGATGTTAGCAAAATTATTGATAATTATAAGAAAATAGTAAAGAATAAATA
ATGTTGATAATTGATAATAAAATAATTAAAGACTTCTGACCCAGCTGATGATGAGCAACTTATAGTCAAGGATAATAATTTTATTCCCT
ATTAAATGAAACTAACAAACATTCTAAAAACTAAAGGATATTGACGAAAATGAGATAGTGTCAAATAAGCAACAAATTCTATTICAATG
TTAAATCATTATAAGCAACACAGAA[TGACAGCAATTGAAATGAT]ACTTAAATAAAAGACTAAGTAGCAGAACATTATTGCT Ca_Neu 4F
[CACAAACGGAAGACGGATCACACTCATCGTATCCCAATGTTACTAAACTTAAACCGGAAATCTAGCGGTGTTGAGATAAAAGAGTAGAAAA Ca_Neu 3R
CATTAGTACTATAATTCGACTTAACTCAAGGTTAAAGAATCATTGAGTGAAGCGGGAAAATCTGAAGGCAAAATAAGGAAATCTTAAAGAT
CTGTTCAAAGAAAACATCGTGTAGTATGATGTTAGTAAATAACAGAAAATTGAGTATTGAGTAAAGGAAACACAAACTAATAAAACAA
GCTTCATTATTGTGATTTTCCAGGAAACAAACTTGTGTCCACATTATCATCGGTGACCCATGATTCTATAGTGTGATCAAGGTAT
CTAAAATGTTGACAAAATTAACAGAAATAATTGATTCTAGATCATCAGTATTAAAGCTGTAGAAGGAGAGGAAAATTGATTGAGAAG
ATATATCCTACAGCTGGTTCTTCAATTCAACAGCACACAAACTAGAGAAACAAACATATGTTGATGATGTTATCATCA
AGATACAAAATCAATTCTGGTAGAGTATGAGAAATGCTATGGAATCAGATTGATGATGATCAATTGAGTATTGCTTACAGCATAAAAT
GTGTTTGATGAAACAGGAAAGGTTACAAACGTAACATAATTGAGCATTGAGGATTAAGAAAT[GAGCATGCTGTATAGCCTAGCCATAAAAT
AGCCACCTTGCAACACTAGAGAAGTTGATGAGGTTAGAAGCATGAACTTACATTGAGTATTGATGAAAGAACACTTCAAGACATGAAATAATCA
TAAGTTGAGGACT[GAGGAAACGAAATAC]ACTTAAACACCAAGCAATGCTTATAATGTTAGAGTAATTACACATTGACTCTA
TGAATAACATGATCATTATGTTTCAATTAGCAGTATAAGGAAAACATGAGCAACAAATCACACCTAATGTTAAACACCAACCTA
CTGTAATCATCTTTGTGAAACAGAACGCGTACTTATGATGCTGCAAGACATACAGGTTGAGCAGGAAATCTTAACTTGAACATTT
TCAAAAAGTACAGATGGTTGATGACTTGAAGCAGTCTGTGATAATGACACATCTAGAAAAGGTTAAAGATATGCAAAATTGGAATCTTACGATGC
AAATATTCTTCAAGGTTAGTATGAGTTGAAAGGAAATAAAAGGTTATTCTCTTCAAAACTCTGCACTGAGCAGAGAAATGTTTAA
TTTATAGCAGATGCAACATTCGAGAAATTTGAGTATTAGGTTAGTATGATAATCAAGAGGATTTGCTTATAGCTATGCGCTTGTACT
AATAAAAGAAAATATAGTATTGAGTATTGAGCTTCAAGGTTAAAGGTTAAATAGATGGGATTGATA[A]CTCTAGACCAAAAGGTTAGC
GGTGGAGAAATCCAATTAGACAAATTAGATTGAAATTAAAG[TTAACCCATTAACTTATGCGGTTTTCTTAATAAAACACGAAATTAGC
TAAATTATTATAAAATAAAATAATTATTATAAAATTGAGGTTAAAGGTTAAATAGAAGGAGCTTAAATAAGAAAACAAATTAA
AAATATTGTTATAACAGTGGCG[CAGCGCTATACCAATGACT]GCCCTATCTGTTCTATAGATAACGCTCAGAACATTAAACAAACGAA
AAATGCAAAAGAAATTGCTTAAATTGAGGTTAAAGGATGATAAAAGGTTTTCAAAATATGAAATAACAA
```

Slika 3: Pregled postavitve začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena za nevraminidazo *M. canis*. Začetni oligonukleotidi so bili izbrani na podlagi genskega zaporedja gena za nevraminidazo *M. canis* PG14^T (MCANPG14_00438). Z odbeljenim okvirjem sta označena start in stop kodon.

Figure 3: Positions of primers used to amplify neuraminidase gene of *M. canis*. Primers used were designed based on the gene sequence of *M. canis* PG14^T neuraminidase gene (MCANPG14_00438). Thick borders outline start and stop codons.

Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje gena za hemaglutinin pri *M. canis* so bili izbrani na podlagi poravanave štirih sorodnih genskih zaporedij domnevnega gena za hemaglutinin. Glede na podatke pridobljene iz podjetja AlphalyzeTM, kamor smo domnevni hemaglutinin poslali na določanje aminokislinskega zaporedja z masno spektrometrijo (glej točko 3.5.8), smo pri sevih *M. canis* UF G1, UF G4, UF 31 in UF 33 identificirali 4 sorodne proteine (UF G1 – WP_044283842, UF G4 – WP_044286246, UF 31 – WP_044091246, UF 33 – WP_044094105). V genomskeih zaporedjih (Brown in sod., 2012) smo poiskali nukleotidna zaporedja pripadajočih proteinov in na podlagi njihove

poravnave določili začetne oligonukleotide za pomnožitev hemaglutininina. Glavna tarča je bil hemaglutinin *M. canis* Larissa - HacA, saj gre za slovenski klinični izolat, ki še nima določenega nukleotidnega zaporedja genoma.

Preglednica 4: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za pomnoževanje tarčnih genov *M. canis*.
Table 4: Primers used to replicate target genes of *M. canis*.

Tarčni gen	Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje 5' → 3'	Tm [°C]
Nevraminidaza <i>M. canis</i>	Ca_Neu 1aF	CGCTATTGAGCATGAAATAACC	63,3
	Ca_Neu 1bF	GGAGCACTTATAACATCGACTTCT	54,4
	Ca_Neu 1R	CAGCATCATCATCAATGTCGTTATC	54,2
	Ca_Neu 2F	GTGATGTCGATGATTCTCGTTAT	53,3
	Ca_Neu 2R	GAGGCCTAACATCAGTTCTTC	54,0
	Ca_Neu 3F	GAACACGAATTCCGTAATACACACAG	54,2
	Ca_Neu 3R	TGATCCGTTCTCGTTGTGAG	54,6
	Ca_Neu 4F	GGAACAGCAATTGAAAATGATCAC	53,3
	Ca_Neu 4R	TGTATTCCGTTTCCTACCCC	54,0
	Ca_Neu 5F	GAGCATGCTGTATATGCCCTAG	53,3
	Ca_Neu 5aR	CTCCACCTTTGGCTTAGAG	52,1
	Ca_Neu 5bR	AGTCATTGGTATAGCCGCTG	54,6
Hemaglutinin <i>M. canis</i>	Ca_Hap 1F	CACGCATAAATTGGATGTATACTG	52,1
	Ca_Hap 1R	GACCAATGGGTATTATGATAATCC	51,6
	Ca_Hap 2F	GGACCTCGTAGTGGTATAACA	53,3
	Ca_Hap 2R	CACACCAGGCTTGAATATAACA	53,3
	Ca_Hap 3F	ACAATGAATGTAGTCTGGTAGT	51,6
	Ca_Hap 3R	TCTGTGGATAGAATTATAGATACCAA	51,0
	Ca_Hap 4F	CAAAGGCTTCAAGATTGTAATCA	52,0
	Ca_Hap 4R	CTAGGGTACGATGATATATTCAAAC	51,3
	Ca_Hap 5F	GACGTTTAGTAATGGATATTGTCA	51,2
	Ca_Hap 5R	CAGATGACAAGCCTATATTGG	51,1
	Ca_Hap 6F	TAGTGGAACGAAGGGATCAA	53,1
	Ca_Hap 6R	AAGCTAATGATGATGAAGCGG	53,0
	Ca_Hap 7F	CAATAAAGATCGTCGGGTAAAC	51,9
	Ca_Hap 7R	GAAAACCTAACGAATGAATCGA	51,8
	Ca_Hap 8F	CATAGACTCCGATTAGAAGTTC	50,6
	Ca_Hap 8R	GAACCTAAATTGAACCAGTGG	51,9
	Ca_Hap 9F	CTTGAAAGCTTGAATTGAGCAG	53,0
	Ca_Hap 9R	CTATCCATAAAATTCTCCTTTGCA	51,7

3.2.1.2 Pomnoževanje genov za nevraminidazo in hemaglutinin *M. cynos*

V genomu *M. cynos* C142 (Walker in sod., 2013) sta prisotna dva gena za nevraminidazo. Izbrali smo 8 parov začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za pomnožitev obeh genov pri različnih sevih *M. cynos*.

Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za pomnoževanje tarčnih genov *M. cynos*.
Table 5: Primers used to replicate target genes of *M. cynos*.

Tarčni gen	Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje 5' → 3'	Tm [°C]
<i>M. cynos</i>	Cy_Neu 1F	GCATTGGTAAATTATTCGCGACTAT	52,4
	Cy_Neu 1R	CGATATCTTTCGCGCTTCT	53,0
	Cy_Neu 2F	GGTATAATTGATCCTAAAATGAAA	47,1
	Cy_Neu 2R	TTTTATCAGGAAAAATATCGACAAA	49,4
	Cy_Neu 3F	AGGCTTAACGATCGATGGAA	53,7
	Cy_Neu 3R	AATCCGCGATCATTTCTGAG	52,8
	Cy_Neu 4F	AAGCTACGACAATGGAA	47,9
	Cy_Neu 4R	AACTAAAACCACCTTCATATAGTAA	48,3
	Cy_Neu 5F	TTGGTGCATTTATTATAGTTTCAGA	50,8
	Cy_Neu 5R	TTTGAAATAAAAGCTGCACGAG	52,1
	Cy_Neu 6F	AAAGATTAGTGATTCATCACACAAAGA	53,1
	Cy_Neu 6R	AATTGCCCTCCAATTGCTA	52,6
	Cy_Neu 7F	ATTTCGGCTAAATTGGAA	50,2
	Cy_Neu 7R	CGTCATTAAATGTTTATCAGCAA	50,4
	Cy_Neu 8F	GGCGGCAACACTTGAATAAA	54,0
	Cy_Neu 8R	AAGCGGAAGAGCATTGAA	52,9
<i>M. cynos</i>	Cy_Hap 1F	AGTATGATGTTAGTGAGCCGATTG	54,7
	Cy_Hap 1R	CTGTTCCCTGGTGCAGGATT	55,3
	Cy_Hap 2F	AGATTCTAGCACAGAACATAGA	53,6
	Cy_Hap 2R	TCCTTGTGTCTAACAGTCTG	54,2
	Cy_Hap 3F	GACCATAATGCTAATCATAACAG	48,7
	Cy_Hap 3R	CTATTGGAATAATCCAAGACC	48,3
	Cy_HapP 2F	AAAAGGAACCTGTTCGTTTGG	52,3
	Cy_HapD 1R	GTTCTGGAGTGTCTTAGGC	52,9
	Cy_Hap30 2R	CCATCGATTTCGCTAACAG	52,5

Začetne oligonukleotide smo izbrali na podlagi znanega zaporedja celotnega gena MCYN_RS01800, ki kodira protein z 943 aminokislinami (NCBI MCYN_RS01800, *M. cynos* C142 complete genome, NC_019949, lega genskega zaporedja od 402958 do 405789 bp) ter zaporedja gena MCYN_RS01805, ki kodira skrajšan protein z le 679 aminokislinami (NCBI MCYN_RS01805, *M. cynos* C142 complete genome, NC_019949, lega genskega zaporedja od 406867 do 408906 bp). V prilogi B je prikazana razporeditev izbranih začetnih oligonukleotidov glede na obe genski zaporedji.

Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje gena za hemaglutinin pri *M. cynos* so bili izbrani na podlagi zaporedja gena za domnevni hemaglutinin *M. cynos* C142 (NCBI MCYN_RS01445, *M. cynos* C142 complete genome, NC_019949, lega genskega zaporedja od 312238 do 313419 bp; Walker in sod., 2013).

3.2.2 Izolacija genomske DNA in določanje koncentracije

Genomsko DNA smo izolirali s kompletom reagentov RTP Spin Bacteria DNA mini (Invitek, Nemčija). 50 ml kulture mikoplazem v pozni logaritemski fazi smo centrifugirali 10 min pri $12000\times g$ (Sorvall RC 5C, ZDA). Celični sediment smo sprali v pufru PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ in 0,23 g KH₂PO₄) smo raztopili v 990 ml Milli-Q vode; pH smo s pomočjo HCl uravnali na 7,40, dodali Milli-Q vodo in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C) ter suspenzijo ponovno centrifugirali 10 min pri $20000\times g$. Pridobljeno celično usedlino smo uporabili za izolacijo DNA po protokolu za izolacijo DNA iz bakterij po navodilih proizvajalca s priloženimi reagenti. Vzorci genomske DNA so bili do uporabe shranjeni na -20°C.

Koncentracijo izolirane DNA smo izmerili na spektrofotometru NanoVue (GE Healthcare, Velika Britanija) s programom za merjenje absorbance pri 260 nm. Pridobili smo podatke o koncentraciji ($\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$) in razmerjih A260/A280 ter A260/A230 ter tako določili kakovost izolirane DNA.

3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo

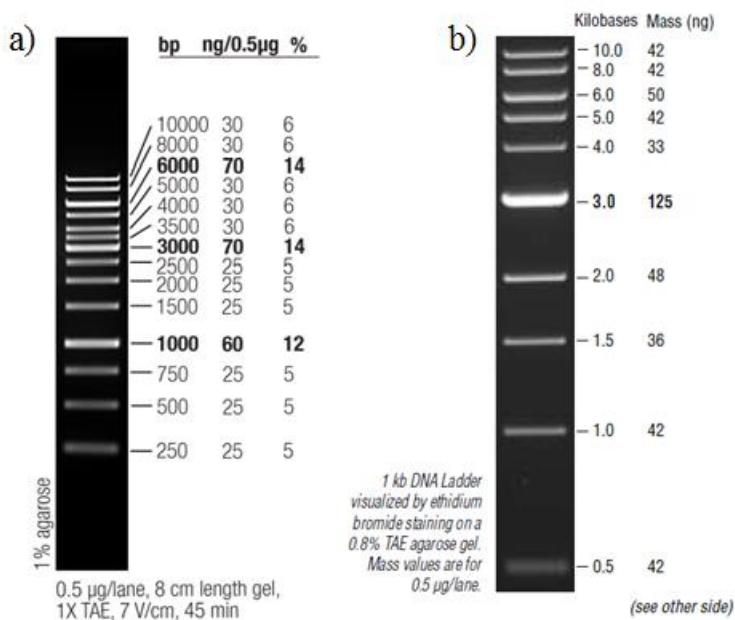
Z uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov (preglednici 4 in 5) smo z metodo verižne reakcije s polimerazo (angl. PCR, polymerase chain reaction) pomnožili tarčne odseke genomske DNA.

V 30 μl reakcijske mešanice smo dodali 1 μl mikoplazemske DNA, 10 pmol F in R oligonukleotidnega začetnika, 20 mM posameznega dNTP, 3 μl 10x Taq DNA polimeraznega sinteznega pufrja, 2,4 μl 25 mM MgCl₂ in 1,5 U Taq DNA polimeraze (ThermoFisher Scientific, ZDA). Stripe z reakcijsko mešanicijo smo vstavili v termostatski aparat za PCR. Po začetni denaturaciji, ki je potekala 5 min pri 94°C je sledilo 35 ciklov v naslednjem zaporedju: denaturacija 30 sekund pri 94°C, prileganje 30 sekund pri Tm (Tm je odvisna od kombinacije oligonukleotidnih začetnikov, glej preglednici 4 in 5) in sinteza DNA 75 sekund pri 72°C. Zaključna sinteza je tekla 7 minut pri 72°C.

3.2.4 Elektroforeza genomske DNA in produktov PCR v agaroznem gelu

Z agarozno elektroforezo smo preverjali uspešnost izolacije DNA in pomnoževanja genov s PCR. Pri tem smo za potrditev velikosti fragmentov na gelu uporabljali dve velikostni

lestvici velikosti 1 kb (SM0311, Fermentas, Litva; DNA Ladder N3232S, New England BioLabs, Anglija; slika 4). Predhodno smo pripravili tudi 10-kratni TBE pufer, ki je vseboval 0,5 M Tris bazo (Sigma, ZDA), 0,5 M borovo kislino (Merck) in 10 mM EDTA (Sigma, ZDA). pH smo uravnali na 8,30. Za potrebe agarozne gelske elektroforeze smo uporabili 0,5-kratni TBE pufer.



Slika 4: Velikostna lestvica za agarozno elektroforezo. a) Velikostna lestvica 1 kb Fermentas; b) Velikostna lestvica 1 kb New England Biolabs.

Figure 4: Agarose gel electrophoresis marker. a) 1 kb marker Fermentas; b) 1 kb marker New England Biolabs.

Uspešnost izolacije genomske DNA, verižne reakcije s polimerazo in velikosti PCR produktov smo preverili z nanosom vzorcev na 1%- ali 1,5%- agarozni gel (glede na pričakovano dolžino fragmentov). Agarozni gel, ki smo ga pripravili iz založne raztopine agaroze ustrezno redčene v 0,5-kratnem TBE pufru, smo segrevali dokler se agaroza ni popolnoma raztopila. Tekočemu gelu smo dodali $0,5 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ etidijevega bromida (Sigma, ZDA), ki omogoča opazovanje po velikosti ločenih produktov pod UV svetlobo (fluorescencija pri 312 nm). Na strjeni gel smo nanesli vzorce ($5 \mu\text{l}$), ki smo jim primešali 2 μl nalagalnega pufra (4 g saharoze in 25 mg ksilen cianola smo zmešali z 10 ml destilirane vode). Za optično odčitavanje velikosti pomnoženih fragmentov smo uporabili primerjavo z lestvico.

3.2.5 Določanje nukleotidnega zaporedja

DNA fragmente, pomnožene z metodo PCR, ki smo jim želeli določiti nukleotidno zaporedje, smo poslali na Macrogen (Nizozemska), kjer so za nas opravili čiščenje PCR produktov in določanje nukleotidnega zaporedja.

3.2.6 Analiza nukleotidnih zaporedij z bioinformacijskimi orodji

Posamezne kontige nukleotidnega sekvenciranja, ki smo jih pridobili od podjetja Macrogen, smo združili v ustrezna genska zaporedja v programu Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation, ZDA). Nukleotidna zaporedja podobnih genov različnih sevov smo med seboj primerjali z orodjem ClustalOmega (Sievers in Higgins, 2014). Nekatera nukleotidna zaporedja smo pretvorili v aminokislinska zaporedja z orodjem ExPASy Translate Tool (Gasteiger in sod., 2003).

3.2.7 Izolacija RNA ter prepis v cDNA

Ker smo želeli določiti nukleotidno zaporedje izraženega gena za hemaglutinin *M. cynos*, smo izolirali celokupno RNA, jo prepisali v cDNA in ponovili PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (preglednica 5). 50 ml tekoče kulture sevov *M. cynos* smo centrifugirali 10 min pri $12000\times g$ in celično usedlino resuspendirali v 200 μl RNase Free Water. RNA smo izolirali s kompletom reagentov Rneasy Mini Kit (kat. št. 74104, Qiagen, Nizozemska) po navodilih proizvajalca. Koncentracijo izolirane RNA smo izmerili na spektrofotometru NanoVue ($\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$) in jo do uporabe shranili na -70°C.

Pred prepisom v cDNA, smo izolirano RNA tretirali z DNazo I (#EN0521, Thermo Fisher Scientific, ZDA). 1 μg RNA smo dodali 10x reakcijski pufer z MgCl_2 , 1U DNaze I in dopolnili reakcijsko mešanico z DEPC-tretirano vodo (#R0601, Thermo Fisher Scientific, ZDA). Mešanico smo 30 minut inkubirali pri 37°C, dodali 1 μl 50 mM EDTA ter še 10 minut inkubirali na 65°C. Tako pripravljena RNA predstavlja matrico za obratno transkripcijo.

Obratno transkripcijo smo izvedli po navodilih proizvajalca kompleta reagentov High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (4374966, Applied Biosystems, ZDA). V reakcijski mešanici smo pripravili zmes RNA tretirane z DNazo I in 2x RT Mastermix (10x RT Buffer, 25x dNTP mix 100 mM, 10x RT Random Primers, 1U

Multiscribe Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor in Nuclease-Free Water). Pripravili smo 20 µl PCR reakcije, ki smo jih pomnožili v termostatskem aparatu za PCR v naslednjem zaporedju temperatur: 10 minut pri 25°C, 2x 60 minut pri 37°C in 5 minut pri 85°C. Tako pripravljeno cDNA smo uporabili v novi PCR reakciji s primerji za pomnoževanje hemaglutinina *M. cynos* (preglednica 3). Do uporabe smo cDNA shranili na -20°C. V specifični PCR reakciji smo kot pozitivno kontrolo uporabili genomsko DNA uporabljenega seva *M. cynos*, kot negativno kontrolo pa RNA tretirano z DNazo I, torej vzorec pred obratno transkripcijo. Tudi te PCR produkte smo poslali na čiščenje in določanje nukleotidnega zaporedja na Macrogen.

3.3 PRIPRAVA SPECIFIČNIH PROTITELES

3.3.1 Priprava antiga za imunizacijo

Želeli smo pridobiti monoklonska protitelesa, usmerjena proti hemaglutininu in nevraminidazi *M. canis* in *M. cynos*. Pripravili smo tekoči kulturi *M. canis* Larissa in *M. cynos* 105 pri katerih smo predhodno testirali sposobnost hemaglutinacije in nevraminidazno aktivnost. Kulturi smo centrifugirali 20 minut pri 12000×g, odlili supernatant, celično usedlino sprali s pufom PBS in ponovno centrifugirali 10 min pri 20000×g. Sprano celično usedlino smo redčili 1 : 1 s pufom PBS in ta vzorec uporabili za imunizacijo miši.

3.3.2 Imunizacija

Imunizacijo in vse nadaljnje postopke za pridobivanje monoklonskih protiteles smo izvedli v Celičnem laboratoriju in v Centru za revo laboratorijskih živali Oddelka za zootehniko (Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani), v skladu z dovoljenjem št. 34401-36/2009/2. Za imunizacijo smo uporabili dva različna protokola – klasični postopek z uporabo Freundovega adjuvansa ter novejši postopek z uporabo reagenta Magic™ Mouse Adjuvant. Za prvo imunizacijo smo po klasičnem postopku pripravili mešanico 150 µl celic v pufru PBS in 150 µl kompletnega Freundovega adjuvansa. Mešanico smo dobro resuspendirali in jo s Hamilton iglo intraperitonealno injicirali v BALB/c miško. Tri tedne po prvi imunizaciji smo izvedli drugo imunizacijo z istima antigenoma in intraperitonealno injicirali 150 µl mešanice antiga in nekompletnega Freundovega adjuvansa. Tri dni pred žrtvovanjem miši smo izvedli pozitivno imunizacijo, pri kateri smo intraperitonealno

vbrizgali 150 µl supernatanta kulture, ki smo jo čez noč gojili v tekočem gojišču s proteini nizkih molekulskih mas (glej 3.5.3).

Pri prvi imunizaciji z MagicTM Mouse adjuvansom smo pripravili mešanico 30 µl celične usedline ter 50 µl adjuvansa, ki smo jo BALB/c miški injicirali intramuskularno. Tri tedne po prvi imunizaciji smo pripravili enako mešanico celic in adjuvansa ter intramuskularno izvedli drugo imunizacijo. Tretjo imunizacijo smo izvedli en mesec po drugi imunizaciji z mešanico celic in adjuvansa (1 : 1) za *M. canis* ter mešanico brezceličnega supernatanta in adjuvansa (1 : 1) za *M. cynos*.

V obeh primerih smo dva tedna po drugi imunizaciji odvzeli kri iz repa in z encimsko imunskim testom DIBA (angl. dot immunobinding assay) testirali na prisotnost protiteles proti *M. canis* in *M. cynos*. Kri smo centrifugirali 10 minut pri 3000 obratih in za teste uporabili zgornjo plast – mišji serum. Na membrano PVDF (Immobilon-P, 0,45 µm, Millipore, ZDA) smo narisali mrežo kvadratkov 0,5 x 0,5 cm ter jo aktivirali v 100-% metanolu in sprali v destilirani vodi. Pripravili smo celice *M. canis* ali *M. cynos* v ustrezni redčini in nanesli 2 µl antiga na posamezen kvadratek. Membrano smo nato 1 uro inkubirali v raztopini za blokiranje (0,5-% Tween 20 v pufru PBS) in 1 uro v različnih redčitvah ustreznega mišjega seruma (anti *M. canis* oz. anti *M. cynos*). Sledilo je spiranje membrane v 0,05-% Tween 20 v pufru PBS (3 x 10 minut) in enourna inkubacija v kozjih protitelesih proti mišjim IgG, označenih s hrenovo peroksidazo (A4416, Sigma, ZDA). Po spiranju membrane v 0,05-% Tween 20 v pufru PBS (2 x 10 minut) in pufru PBS (1 x 10 minut) smo na membrano nanesli peroksidazni substrat TrueBlue (KPL, ZDA). Postopek smo ponovili tudi dva tedna po drugi imunizaciji. V obeh primerih je bil imunski odziv ustrezen, zato smo nadaljevali s pripravo protiteles.

3.3.3 Priprava mišje mielomske linije NS-07

Za fuzijo z vraničnimi celicami smo predhodno pripravili kulturo mišjih mielomskeh celic NS-07. Kulturo, ki je bila zamrznjena v tekočem dušiku (Genska banka Oddelka za zootehniko), smo odmrznili, dodali sterilno gojišče DMEM (Sigma, ZDA) in centrifugirali 10 minut pri 900 obratih. Supernatant smo odsesali in celično usedlino resuspendirali v gojišču, ki je vsebovalo DMEM, 10 % FBS (Sigma, ZDA) in 0,1 % gentamicina (Krka, Slovenija). Gojitvene posodice smo hranili v inkubatorju pri 37 °C in 5-% CO₂.

3.3.4 Fuzija

Tri dni po zadnji imunizaciji smo s cervikalno dislokacijo žrtvovali BALB/c miške. Takoj po usmrтitvi smo iz vratne vene pobrali kri v sterilno epico in jo centrifugirali 15 minut pri 2000 obratih ter odpipetirali imunski serum, ki smo ga uporabili v nadaljnih analizah. Po standardnem postopku (Goding, 1996) smo miški sterilno odstranili vranico in jo namočili v DMEM mediju. Vranico smo macerirali skozi sito iz staničevine s približno 10 ml DMEM medija in vse skupaj centrifugirali 10 minut pri 900 obratih. Supernatant smo odstranili in celično usedlino resuspendirali v 10 ml DMEM medija. Pod mikroskopom smo z uporabo Bürker-Turk števne komore izračunali število mielomskeh in vraničnih celic v vzorcih ter glede na predpisano razmerje za fuzijo (vranične celice : mielomske celice = 7 : 1) pripravili potreben volumen celic. Fuzijo smo izvedli po protokolu, ki sta ga opisala Howard in Kaser (2007): 1 ml PEG v 60 sekundah, resuspendiranje celične zmesi, 1 ml DMEM v 30 sekundah, 3 ml DMEM v 30 sekundah ter 16 ml DMEM v 60 sekundah. Celotno zmes smo centrifugirali 10 minut pri 1000 obratih, supernatant zavrgli, celice pa resuspendirali v specifičnem gojišču, ki je vsebovalo DMEM medij, 20 % FBS (HyClone), 2 % HAT in 0,1 % gentamicina. Celice smo prenesli v gojitvene (mikrotiterske) plošče s 96 luknjami (200 µl/luknjo) in jih 10 dni gojili v CO₂ inkubatorju pri 37°C.

3.3.5 Selekcija klonov

Po 10 dnevih rasti smo preverili ali so v luknjicah prisotni hibridomi, ki izločajo protitelesa. Iz luknjic, v katerih so bile prisotne celice smo odpipetirali 200 µl supernatanta kulture in z metodo DIBA testirali ali so v supernatantu prisotna protitelesa proti antigenom *M. canis* in *M. cynos*. Hibridome, ki so v testu DIBA močno reagirali, smo nadalje gojili in tudi klonirali z metodo mejne redčitve (angl. limiting dilution). Supernatante izbranih uspešnih klonov smo testirali še z metodama inhibicije hemaglutinacije in indirektnim imunoperoksidaznim testom. Supernatante klonov, ki so vsebovali specifična protitelesa, smo uporabili v imunskeih testih na membrani Immobilon-P, kjer smo testirali vezavo protiteles na specifične proteine *M. canis* in *M. cynos*, prenešene na membrano.

3.3.6 Pridobivanje protiteles

Uspešne klone hibridomov smo postopoma gojili v vedno večjih količinah brezserumskega gojišča (Serum-Free Medium, HyClone). Zbirali smo večje količine supernatanta celične

kulture (do 200 ml) in iz njega z uporabo amonijevega sulfata specifično očistili protitelesa. Koncentracijo monoklonskih protiteles smo izmerili na aparatu NanoVue.

3.4 PRIPRAVA REKOMBINANTNEGA PROTEINA HapA

3.4.1 Kompetentne celice *Escherichia coli*

Za vnos vključka in ekspresijo rekombinantnega hemaglutinina *M. cynos* (rHapA) smo uporabili kompetentne celice *E. coli* DH5 α (Bethesda Research Laboratories, 1986). Gre za nepatogeni sev, ki je bil razvit posebej za potrebe laboratorijskega kloniranja. Mutacije seva DH5 α se izražajo kot fenotip: lacZ Delta M15 Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 (Taylor in sod., 1993).

3.4.2 Začetni oligonukleotidi za pripravo rekombinantnega proteina

Za potrebe priprave rekombinantnega proteina HapA *M. cynos* smo potrebovali začetne oligonukleotide za potrditev vstavitve vključka v plazmid (pQE-F in pQE-R) in dodatne začetne oligonukleotide, s katerimi smo potrdili pravilnost orientacije nukleotidnega zaporedja po ekspresiji gena (preglednica 6).

Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za pripravo genskega vključka *rhapA* in preverjanje pravilnosti vstavitve genskega konstruktka.

Table 6: Primers used to make a *rhapA* gene construct and to verify the intermediate steps in rHapA preparation.

Tarčni gen	Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje 5' → 3'	Tm [°C]
Plazmid pQE 30	pQE-F	GAGCGGATAACAATTTCACACAG	54,3
	pQE-R	GTTCTGAGGTCAATTACTGGATCTAT	53,8
Rekombinantni protein <i>M. cynos</i> HapA	rHAP 1F	GCTAGTGTGGGATCCTGTGCTAAAAAACCTAGTCC	63,6
	rHAP 1R	AGTCTCGTAAATTGCCAAATTAAATTCACCTTC	58,0
	rHAP 2F	GAATTAAATTGGCAAATTACGAGACTGTTAGACAAC	58,4
	rHAP 2R	TTTTTAGGATCCTGTTGTGAATTGGTTTG	58,7
	rHAP 3R	TTTTAAAGCTTGTGAATTGGTTTG	57,2

3.4.3 LB (Luria-Bertani) tekoče in trdno gojišče

Za potrebe priprave rekombinantnega proteina smo pripravili LB tekoče in trdno gojišče za rast celic *E. coli*. Za tekoče gojišče smo 10 g peptona (Biolife, Italija), 10 g NaCl (Merck, Nemčija) in 5 g kvasnega ekstrakta (Difco, ZDA) raztopili v 900 ml Milli-Q vode. Z

uporabo 1 M NaOH smo uravanali pH na 7,00, dopolnili do 1000 ml z Milli-Q vodo in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Gojišče smo ohladili na 50 °C ter dodali 1 ml sterilno filtriranega antibiotika ampicilina (Sigma, ZDA) v končni koncentraciji 50 µl ml⁻¹. Za pripravo agarskih plošč smo 2,5 g peptona, 2,5 g NaCl in 1,25 g kvasnega ekstrakta raztopili v 200 ml Milli-Q vode. Z 1 M NaOH smo uravnali pH na 7,00, z Milli-Q vodo dopolnili do 250 ml in gojišče avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Ko se je agar ohladil na 50 °C smo dodali 250 µl ampicilina v končni koncentraciji 50 µl ml⁻¹. Agarsko gojišče smo sterilno razlili v petrijevke in pustili, da se ohladi in strdi.

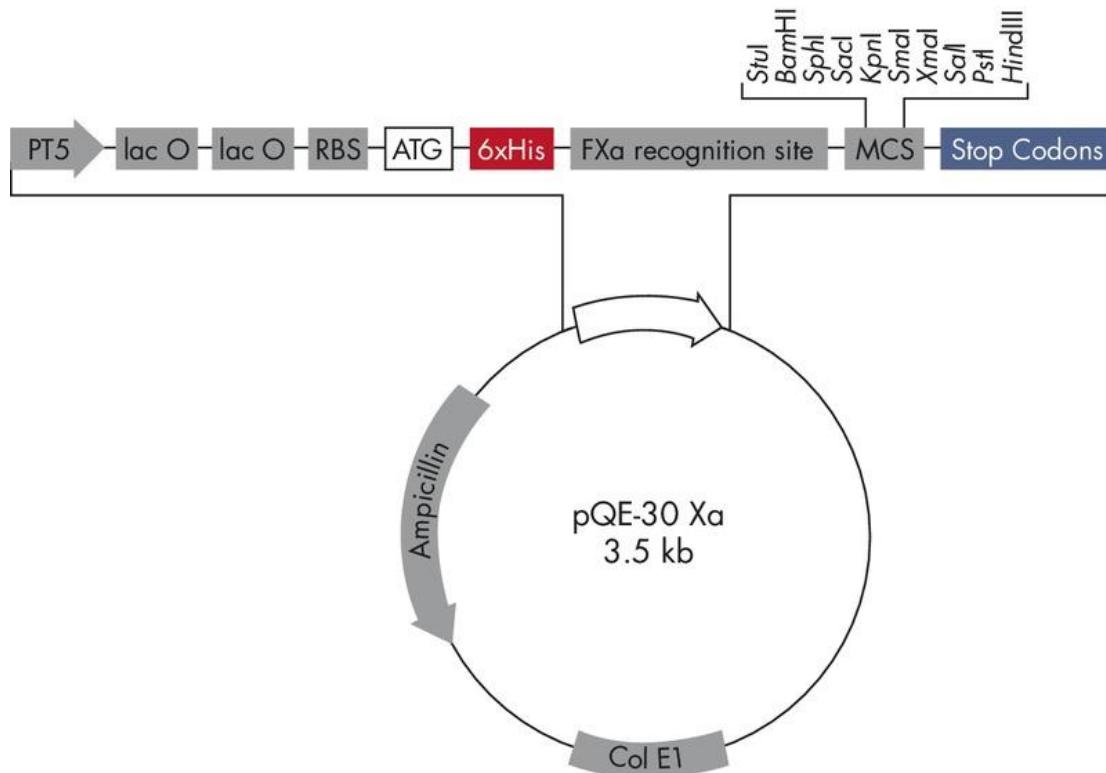
3.4.4 Priprava vključka genomske DNA za kloniranje

Za pripravo želenega genskega vključka smo uporabili začetne oligonukleotide rHAP 1F, 1R, 2F, 2R in 3R (preglednica 6), ki so bili pripravljeni na podlagi zaporedja domnevnega gena za hemaglutinin *M. cynos* C142 (NCBI MCYN_RS01445, glej 3.2.1.2.). Začetna oligonukleotida rHAP 1F in 3R sta bila prirejena tako, da sta vsebovala tudi 6 mestni zaporedji, s katerimi smo v genski vključek vnesli BamHI in HindIII restrikcijski mesti. Restrikcijski mesti sta bili potrebni za vključitev gena v vektor. Pri mikoplazmah je priprava rekombinantnih proteinov lahko težavna. Imajo namreč spremenjen genetski kod, pri katerem kodon UGA kodira aminokislino triptofan, pri celicah *E. coli* pa ta isti kodon kodira stop kodon, ki onemogoča nadaljnji prepis proteina. Ker v zaporedju gena za hemaglutinin ta kodon ni prisoten, nam ni bilo potrebno vnašati točkovnih mutacij.

Gen *hapA* smo namnožili v dveh zaporednih PCR reakcijah. V prvi smo ločeno pomnožili dva fragmenta gena *hapA* *M. cynos* 896, enega s parom rHAP 1F/1R in drugega s parom rHAP 2F/2R v 30 µl reakciji. Uspešnost reakcije smo preverili z nanosom PCR produktov na agarozni gel. PCR produkte smo očistili s kitom FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics, Japonska) in izmerili koncentracijo DNA v očiščenih vzorcih. V drugi, 50 µl PCR reakciji z 1U Taq DNA polimerazo in mešanico 1x PCR pufra, 200 mM dNTP, 50 pmol posameznega začetnega oligonukleotida (rHAP 1F/3R), smo uporabili 2 pmol posameznega produkta. Program pomnoževanja je bil sestavljen iz začetne denaturacije (5 minut pri 94 °C), 45 ciklov zaporedja 30 sekund pri 94 °C, 30 sekund pri 56 °C in 1 minuto pri 72 °C ter zaključne sinteze pri 72 °C, ki je tekla 7 minut. Združeni PCR produkt, ki je vseboval celotno zaporedje gena *hapA* smo ponovno izrezali iz gela in očistili s kitom FastGene Gel/PCR Extraction Kit. PCR produkt smo uporabili v nadalnjih korakih priprave rekombinantnega proteina.

3.4.5 Izbira in priprava vektorja ter PCR pomnožka

Za pripravo rekombinantnega proteina smo izbrali 3461 bp velik krožni vektor pQE-30 Xa (Qiagen), ki vsebuje med drugim BamHI in HindIII restrikcijski mesti, gen za odpornost na ampicilin in 6xHis značko (slika 5). pQE30 plazmid in genski konstrukt smo cepili z BamHI in HindIII restrikcijskima encimoma. Pri pripravi reakcijske mešanice smo bili pozorni na koncentracijo plazmida in PCR vključka, prav tako mora biti količina cepljenih produktov primerna za pripravo ligacijske mešanice v razmerju 1 : 3 = vektor : PCR produkt. Restrikcija je potekala čez noč (16 ur) pri 37 °C na stresalniku. 20 µl mešanica je vsebovala 1 µl BamHI in 0,5 µl HindIII restrikcijskega encima, 0,5 µg vektorja na PCR produkt in 10-kratni pufer R (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; 10 mM MgCl₂; 100 mM KCl; 0,1 mg ml⁻¹ BSA).



Slika 5: Grafični prikaz sestave plazmidnega vektorja pQE-30 Xa s prikazom pozicije restrikcijskih mest znotraj MCS.

Figure 5: Graphical representation of pQE-30 Xa plasmid vector, also denoting the position of used restriction sites within MCS.

3.4.6 Ligacija DNA

PCR produkt smo v vektor vstavili z uporabo Rapid DNA Ligation Kit (K1422, Thermo Scientific, ZDA) po navodilih proizvajalca. Linearni vektor in DNA vključek smo zmešali v razmerju 1 : 3 ter dodali pufer 5x Rapid Ligation Buffer, 5U T4 DNA ligase in do 20 µl dopolnili z vodo brez nukleaz. Vzorec smo temeljito premešali ter mešanico inkubirali 5 minut pri 22 °C. Do uporabe smo ligacijsko mešanico shranili v hladilniku. Uspeh ligacije smo preverili z analizo na 1%- agaroznem gelu, kamor smo nanesli vektor s PCR vključkom po restrikciji, ligacijsko mešanico in krožni vektor pQE-30 Xa kot kontrolo.

3.4.7 Transformacija kompetentnih celic

Kompetentne celice *E. coli* DH5α so bile zamrznjene na -70 °C v obliki žive celične kulture v logaritemski fazi rasti. Celice smo sterilno nacepili na LB agarske plošče brez ampicilina in pustili rasti čez noč na 38 °C. Naslednji dan smo si pripravili potrebno število epruvet, ki so vsebovale 2 ml C-medija. S sterilno zanko smo postrgali posamezne kolonije *E. coli* in vsako prenesli v svojo epruveto, te pa smo ponovno inkubirali čez noč pri 37 °C.

Vektor, za katerega smo predhodno potrdili, da vsebuje naš vključek, smo vnesli v kompetentne celice *E. coli* DH5α z uporabo kompleta reagentov TransformAid Bacterial Transformation Kit (K2710, Thermo Scientific, ZDA) po navodilih proizvajalca. 150 µl kulture *E. coli*, ki smo jo čez noč inkubirali v C-mediju, smo prenesli v nove centrifugirke s svežim in ogretim C-medijem ter jih inkubirali 20 minut pri 37°C na stresalniku. Kulturo smo nato centrifugirali 1 minuto pri 10000×g, zavrgli supernatant, celice pa resuspendirali v 300 µl predhodno pripravljeni T-raztopine. Mešanico smo na ledu inkubirali 5 minut, nato zopet centrifugirali 1 minuto pri 10000×g ter zavrgli supernatant. Celični pelet smo resuspendirali v 120 µl T-raztopine in mešanico inkubirali na ledu 5 minut. V ločene mikrocentrifugireo smo si pripravili po 5 µl ligacijske mešanice, ki smo jo ohladili na ledu. V vsako mikrocentrifugirko, ki je vsebovala ligacijsko mešanico, smo dodali 50 µl pripravljenih kompetentnih celic ter vse skupaj 5 minut inkubirali na ledu. Celice z ligacijsko mešanico smo nanesli na predhodno ogrete LB agarske plošče, ki so vsebovale antibiotik ampicilin. Plošče smo čez noč inkubirali na 37 °C.

3.4.8 Preverjanje vgradnje vključka

S PCR smo preverili ali se je naš vključek vgradil v celice *E. coli* DH5α. Na agarskih ploščah so čez noč zrastle številne kolonije, ki smo jih testirali na prisotnost vključka. Pripravili smo 10 µl PCR reakcije z začetnima oligonukleotidoma rHAP 1F in rHAP 3R. Polovico izbrane kolonije smo s sterilno cepilno zanko prenesli v reakcijsko epico za PCR k 10 µl PCR mešanice. PCR je potekal v 40 ciklih po protokolu: začetna denaturacija 5 minut pri 94 °C, 40 ciklov zaporedja 30 sekund pri 94 °C, 30 sekund pri 55 °C in 75 sekund pri 72 °C ter zaključne sinteze pri 72 °C, ki je tekla 7 minut. Na agaroznem gelu smo preverili, katere kolonije vsebujejo naš vključek.

3.4.9 Gojenje transformiranih celic in sinteza rekombinantnega proteina

Preostalo polovico celičnih kolonij, za katere smo z metodo PCR potrdili vsebnost vključka, smo s sterilno cepilno zanko prenesli v 2 ml tekočega LB gojišča z ampicilinom in jih čez noč gojili na stresalniku pri 37 °C.

Po inkubaciji transformiranih *E. coli* celic, ki so vsebovale genski vključek *hapA*, smo z uporabo 0,5 mM IPTG inducirali ekspresijo rekombinantnega proteina HapA. 750 µl čeznočne kulture *E. coli* smo prenesli v 17 ml tekočega LB gojišča z ampicilinom (predhodno ogret na 37 °C). Preostanku čeznočne kulture (1250 µl) smo dodali 5 ml LB tekočega gojišča z ampicilinom in ga shranili v hladilnik. Erlenmajerice s kulturami smo inkubirali na stresalniku pri 37 °C, dokler izmerjena absorbanca pri 600 nm ni dosegla vrednosti med 0,6 in 0,8 (ozadje meritve predstavlja izmerjena absorbanca samega gojišča). Ko je kultura dosegla željeno vrednost absorbance, smo odvzeli vzorec 1,5 ml, ki smo ga shranili za kasnejše analize, v preostanek kulture pa smo dodali IPTG v končni koncentraciji 0,5 mM in erlenmajerico vrnili nazaj na stresalnik. Po dodatku IPTG smo vsako uro iz celične mešanice odvzeli 1,5 ml kulture, do vključno 5 ur po dodatku IPTG. Vse vzorce celic smo centrifugirali 10 minut pri 15000×g in jih shranili do uporabe na -20 °C. Po petih urah inkubacije v prisotnosti IPTG smo posebej odvzeli 2 ml kulture, ki smo jo uporabili za izolacijo DNA.

3.4.10 Izolacija rekombinantnega proteina

Lizirano celično usedlino smo pripravili v nativnih pogojih in rHapA očistili z Ni-NTA agarozno matrico po navodilih proizvajalca (Qiagen). Celično usedlino, ki je bila shranjena

na -20 °C, smo zmešali s pufrom za lizo in 1 mg ml⁻¹ lizocimom. Mešanico smo inkubirali 30 minut na ledu, nato pa izvedli sonikacijo vzorca (6-kratni cikel 10 sekundnih sunkov in 10 sekundnega premora). Mešanico smo centrifugirali 20 minut pri 10000×g in 4 °C. Za nanos na agarozno matrico Ni-NTA smo uporabili supernatant po centrifugiranju. Vezavo na matrico in elucijo vzorca smo opravili po navodilih proizvajalca. Eluat smo uporabili za analize, s katerimi smo potrdili, da vzorec vsebuje rekombinantni protein rHapA.

3.5 ANALIZE PROTEINOV

Za analizo sinteze hemaglutinina in nevraminidaze *M. canis* in *M. cynos* smo uporabili metode elektroforeze v poliakrilamidnem gelu ob prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE), izoelektrično fokusiranje (IEF) s PhastSystem (LKB Pharmacia, Švedska), analizo po westernu in encimsko imunski test DIBA (angl. dot immunobinding assay).

Kulturo mikoplazem smo gojili v bujonu do pozne logaritemske faze in jo centrifugirali 10 minut pri 12000×g (Sorval RC 5C, ZDA). Supernatantu smo izmerili pH, celično usedlino pa sprali s pufrom PBS in ponovno centrifugirali 10 minut pri 12000×g. Očiščeno celično usedlino smo redčili v ustreznom volumnu PBS. V primeru, da smo celice shranili na -20 °C, smo jih redčili v razmerju 1 : 1 s 100%- glicerolom.

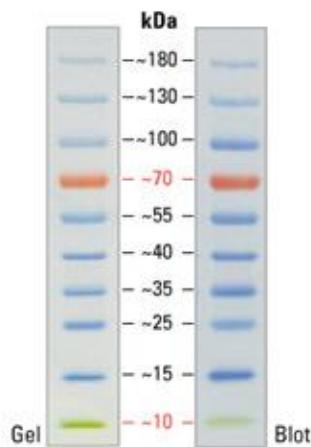
3.5.1 SDS-PAGE in prenos western

Za analizo proteinov celičnih lizatov *M. canis* in *M. cynos* z SDS-PAGE smo uporabili prirejeno metodo po Laemmliju (1970) ter pripravili gel velikosti 8 x 10 cm z 10%- spodnjim ločevalnim gelom in 4%- zgornjim nanašalnim gelom (preglednica 7). Za pripravo gela in ločevanje vzorcev na gelu smo uporabili elektroforezni sistem Mighty Small II Mini Vertical Electrophoresis System (Hoefer, ZDA).

Preglednica 7: Recept za pripravo ločevalnega in nanašalnega gela za SDS-PAGE.
Table 7: Separating and loading gel recipe for SDS-PAGE.

Kemikalija	10%- ločevalni gel za 10 ml	4%- nanašalni gel za 4 ml
destilirana voda	4 ml	2,2 ml
akrilamid/bisakrilamid 30%- raztopina (A3574, Sigma, ZDA)	3,3 ml	0,67 ml
TRIS pufer	2,5 ml(1,5 M, pH 8,8)	1 ml (0,5 M, pH 6,8)
10%- SDS	100 µl	40 µl
10%- APS	100 µl	40 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Na gel smo nanašali vzorce redčene v razmerju 1 : 1 z nalagalnim pufom (0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 100-% glicerol, 10-% SDS, 0,25-% bromfenol modro, dopolniti z destilirano vodo, v primeru reducirajočih pogojev še do 5 % (v/v) β-merkaptoetanola). Vzorce smo pred nanosom na gel 5 minut kuhalili pri 95 °C. Ločevanje na nanašальнem gelu je potekalo 30 do 60 minut pri 80 V, v ločevalnem gelu pa 2 do 4 ure pri 100 V (odvisno od velikosti iskanih proteinov). Za lažje sledenje poteka elektroforeze ter preverjanje velikosti proteinov na poliakrilamidnem gelu ali membrani PVDF smo uporabili velikostni standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder (SM0671, Thermo Fisher Scientific, ZDA). Na gelu in membrani je vidnih 10 proteinskih lise z velikostjo 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130 in 180 kDa (slika 6).



Slika 6: Prikaz kontrolnih lis velikostnega proteinskega markerja PageRuler Prestained Protein Ladder.
Figure 6: Reference protein band profile of PageRuler Prestained Protein Ladder.

Po končani elektroforezi smo gel pobarvali z ireverzibilnim barvilom Coomassie Brilliant Blue R (Sigma, ZDA) ali pa proteine iz gela prenesli na membrano PVDF (0,45 μm, Immobilon-P, Millipore, ZDA) v sistemu Multiphor II Electrophoresis System (LKB Pharmacia, Švedska) za polsuhi prenos. Prenos je potekal 50 do 75 minut pri toku 0,8 mA na cm² membrane. Membrano PVDF s prenešenimi proteini smo uporabili za imunske določanje iskanih proteinov z uporabo specifičnih protiteles. Membrano smo 1 uro blokirali v pufru PBS z dodanim 0,5-% Tween 20 (Sigma, ZDA). Temu je sledila inkubacija v ustrezno redčeni raztopini primarnih protiteles, ki je trajala 1 uro. Membrano smo po inkubaciji v primarnih protitelesih trikrat sprali v pufru PBS z 0,05-% Tween 20 in jo nato 45 minut inkubirali v sekundarnih protitelesih redčenih 1 : 2000. Sekundarna protitelesa, ki so bila označena s hrenovo peroksidazo, so se vezala na primarna protitelesa in omogočala da smo lahko vizualno zaznali obarvane proteinske lise. Po dodatnem spiranju z 0,05-% Tween 20-PBS smo namreč na membrano nanesli kromogeni substrat

TrueBlue (KPL, ZDA), ki v stiku s hrenovo peroksidazo (HRP) povzroči spremembo barve na delu membrane, kjer so vezana sekundarna protitelesa. Modro obarvanje dela membrane povzroči, da vidimo pri katerem proteinu je prišlo do imunske reakcije.

3.5.2 Encimsko imunski test DIBA

S testom DIBA (Benčina in sod., 2014) smo preverjali sintezo specifičnih protiteles pri klonih mišjih hibridomov, vsebnost protiteles proti imunogenim proteinom *M. canis* in *M. cynos* v pasjih serumih, prisotnost hemaglutinina pri različnih sevih *M. canis* in *M. cynos* itd. Vzorce v ustreznih redčitvah smo nanesli na predhodno aktivirano membrano Immobilon-P (2 µl na vzorec). Membrano z vzorci smo 1 uro blokirali v pufru PBS z 0,5-% Tween 20 in eno uro v primarnih protitelesih ustrezne redčitve. Po spiranju z 0,05-% Tween 20-PBS smo membrano 45 minut inkubirali v sekundarnih protitelesih (redčitev 1 : 2000). Sledilo je končno spiranje z 0,05-% Tween 20-PBS in nanos kromogenega substrata TrueBlue.

3.5.3 Sproščanje proteinov *M. cynos* in *M. canis* v tekoče gojišče s proteinimi nizkih molekulskih mas (low-protein medium)

Tekoče gojišče za mikoplazme smo ultrafiltrirali z napravo Amicon Stirred Cell (model 8200, Millipore, ZDA). Uporabili smo membrano, ki iz tekočega medija s filtracijo odstrani vse proteine večje od 10 kDa. Dobljeni filtrat brez proteinov velikih molekulskih mas smo še dodatno sterilizirali s filtracijo.

Vsaj 20 µl celične usedline *M. cynos* v logaritemski fazi rasti (do 100 ml tekoče kulture smo predhodno centrifugirali 20 minut pri $12000\times g$) smo prenesli v 1 ml tekočega gojišča, ki je vsebovalo samo proteine do velikosti 10 kDa. Celice smo inkubirali čez noč na 37 °C, nato pa kulturo centrifugirali 10 min pri $20000\times g$. Dobljene supernatante smo analizirali z SDS-PAGE in analizo western. Preverili smo tudi ali se v supernatantu ohrani sposobnost hemaglutinacije eritrocitov (3.8) ter nevraminidazna aktivnost (3.6).

Enak postopek smo uporabili za izolacijo hemaglutinina HacA *M. canis* Larissa. Celični pelet kulture, ki je imela visoke hemaglutinacijske titre smo čez noč gojili v gojišču s proteinimi nizkimi molekulskimi mas. Naslednji dan smo kulturo centrifugirali in supernatant analizirali, kot je opisano zgoraj.

3.5.4 Izolacija hemaglutinina HapA *M. cynos*

Hemaglutinin *M. cynos* smo izolirali iz brezceličnega supernatanta sevov 896, 1334 in 2296. Supernatant kulture inkubirane preko noči v mediju s proteini nizkih molekulskih mas (glej točko 3.5.3) smo inkubirali skupaj s pasjimi in kokošjimi eritrociti. Do 400 µl brezceličnega supernatanta smo inkubirali z enakim volumnom 20%-raztopine eritrocitov eno uro pri sobni temperaturi. Po centrifugiranju (5 min pri 5000×g) smo odstranili supernatant, eritrocite resuspendirali v PBS in ponovili postopek. Nato smo eritrocite 10 minut inkubirali v kislem pufru (PBS, pH 3,5) in raztopino ponovno centrifugirali. Pridobljeni supernatant smo uravnali na pH ~7,4 z bazičnim pufrom (1 M natrijev bikarbonat, pH 9,8). Supernatante smo testirali z imunsko encimskimi testi in hemaglutinacijo, tudi z uporabo protiteles proti HapA (5G2 in 3B7). Supernatante smo ločili v poliakrilamidnem gelu in proteine prenesli na membrano Immobilon-P.

3.5.5 Izolacija hemaglutinina HacA *M. canis*

Za izolacijo hemaglutinina HacA seva Larissa smo uporabili podoben postopek kot pri *M. cynos*. Supernatant iz točke 3.5.3 smo inkubirali skupaj z 20%-raztopino kokošjih eritrocitov. Ponovili smo postopek iz točke 3.5.4. V hemaglutinacijskem testu je imel zadnji supernatant z izoliranim HacA titer od 1 : 5 do 1 : 10. Proteina velikosti 220 kDa in < 200 kDa sta reagirala s protitelesi 3E3, ki prepoznavajo hemaglutinin *M. canis*.

3.5.6 Elektroelucija proteinov

V primeru, da smo želeli pridobiti večje količine koncentriranega proteina, smo uporabili metodo elektroelucije proteinov iz poliakrilamidnega gela. Poliakrilamidni gel iz katerega smo želeli izrezati ustrezno proteinsko liso, smo za lažjo orientacijo delno obarvali z barvilom Coomassie Brilliant Blue. S skalpelom smo izrezali lise ter koščke gela zdrobili s pinceto. Elektroelucijo smo izvajali z aparatom HSB-Elutor (Biometra, Nemčija). Komoro elutorja smo napolnili z elucijskim pufrom (50 mM Tris, 50 mM glicin, 0,1%-SDS, pH umerimo s HCl na 8,9), vključno z jamicami za vzorce. V primeru, da se v V-kapilarah nahajajo mehurčki, jih je potrebno z iglo odstraniti. Delčke gela smo stresli v jamice za vzorce in s Hamilton iglo v V-kapilare nanesli pufer z visoko vsebnostjo soli (elucijski pufer v katerega smo dodali 1M NaCl – 5,844 g na 100 ml pufra). Ta pufer predstavlja blokado za proteine, da ti ne izhajajo v okoliški elucijski pufer. Elucija je tekla pri napetosti 100 V do največ 120 minut. Čas elucije je bil odvisen od obarvanosti gela,

postopek smo ustavili, ko delci gela niso bili več obarvani. Eluirani proteini se na koncu nahajajo v V-kapilari in jih izvlecemo z uporabo Hamilton igle. Vzorce smo nanesli na membrano Immobilon-P in membrano obarvali z barvilom Coomassie Brilliant Blue, da smo potrdili prisotnost proteinov v vzorcih. Nato smo vzorce s koncentriranimi proteini uporabili v nadaljnji analizah.

3.5.7 Določanje aminokislinskega zaporedja hemaglutinina HapA *M. cynos*

Za potrebe identifikacije hemaglutinina HapA *M. cynos* smo iz membrane Immobilon-P izrezali s Coomassie barvilom obarvano proteinsko liso, za katero smo na podlagi imunskih analiz (tudi detekcijo z monoklonskimi protitelesi 5G2) domnevali, da je hemaglutinin. Vzorec smo poslali na določanje N-terminalnega zaporedja na Institut Jožefa Stefana v Ljubljani (dr. Igor Križaj). Prvič smo na določanje zaporedja poslali približno 65 kDa velik protein, ki je v analizi western reagiral z monoklonskimi protitelesi 5G2 in različnimi pasjimi serumi. Ker je bil protein blokiran na N-terminalnem koncu, smo ponovno na določanje zaporedja poslali krajsi, približno 25 kDa velik cepitveni produkt istega proteina, pri katerem smo dobili močan signal za 23 aminokislin. Pridobljene podatke smo primerjali s podatkovnimi bazami na internetu (BLAST-p).

3.5.8 Določanje aminokislinskega zaporedja hemaglutinina HacA *M. canis*

Na sekvenciranje z masno spektrometrijo smo v podjetje AlphalyseTM na Dansko poslali protein iz SDS-PAGE gela, za katerega smo sklepali, da predstavlja hemaglutinin *M. canis*. Za SDS-PAGE smo uporabili celično usedljino *M. canis* Larissa, ki je izkazovala visoke hemaglutinacijske titre v poskusih s kokošjimi in pasjimi eritrociti (glej 3.8). Protein je v analizi western reagiral s specifičnimi monoklonskimi protitelesi 3E3, za katerega smo potrdili, da prepozna hemaglutinin *M. canis*. Dvakrat smo na sekvenciranje poslali po dve proteinski lisi (višja in nižja lisa na poliakrilamidnem gelu), ki sta imeli molekulsko maso višjo in nižjo od 200 kDa. Na podlagi pridobljenih podatkov o zaporedju peptidov smo z uporabo bioinformacijskih orodij preverili, kateri izmed proteinov v znanih genomskeh zaporedjih sevov *M. canis* UF G1 in UF 31 predstavlja domnevni hemaglutinin HacA *M. canis*.

3.6 ANALIZA NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI (NEAC)

3.6.1 Priprava celic mikoplazem

Celice mikoplazem, ki so rastle v tekoči kulturi do pozne logaritemske faze, smo centrifugirali 10 min pri $12000\times g$. Supernatant smo odstranili in shranili, celično usedlino pa sprali s pufrom PBS pH 7,4 in ponovno centrifugirali 10 minut pri $20000\times g$. Po drugem centrifugiranju smo vizualno ocenili velikost celične usedline in jo 1 : 1 redčili s pufrom PBS. To je bil osnovni vzorec celic, ki smo ga nadalje redčili in uporabili za analize nevraminidazne aktivnosti. Celice smo uporabili takoj ali jih do uporabe shranili na -20 °C.

3.6.2 Nevraminidazna aktivnost

Nevraminidazno aktivnost sevov smo analizirali z uporabo kromogenega substrata BIN (natrijeva sol 5-bromo-4 kloro-3-indolil- α -D-N-acetilnevraminske kisline) (B4666, Sigma, ZDA). Predhodno smo pripravili delovno raztopino v Milli-Q s koncentracijo $0,4 \text{ mg ml}^{-1}$ in jo do uporabe shranili na -20 °C. Vzorec celic, ki je vseboval $10^8\text{-}10^9 \text{ CFU ml}^{-1}$ in je predstavljal približno 100-krat skoncentrirane celice glede na tekočo kulturo, smo ustrezno redčili oz. pripravili dvojno redčitveno vrsto.

10 μl ustrezno redčene celične suspenzije smo zmešali z 10 μl substrata, dobro premešali in inkubirali na sobni temperaturi. Vizualno smo spremljali potek reakcije, beležili čas do pojava pozitivne reakcije, t.j. modrega obarvanja prej brezbarvne raztopine in določili intenziteto obarvanja. Na enak način smo testirali neredčene supernatante tekoče kulture. Za pozitivno kontrolo smo uporabili nevraminidazo tipa V iz bakterije *Clostridium perfringens* (N2876, Sigma, ZDA), kot negativno kontrolo pa pufer PBS. Da bi pokazali, da NEAC ni nespremenljiva lastnost kulture, smo testirali tudi subklone iste kulture.

3.6.3 Vpliv denaturacijskih pogojev na delovanje nevraminidaze

Celične usedline posameznih kultur smo toplotno obdelali, da bi preverili aktivnost nevraminidaze, ko je ta izpostavljena povišanim temperaturam. Celice smo 10 minut inkubirali pri 50 °C, potem pa izvedli test NEAC kot je opisano v točki 3.6.2.

Da bi preverili, kako denaturacijski pogoji vplivajo na delovanje nevraminidaze, smo pripravili še različne redčitve SDS. SDS, ki smo ga dodali celični suspenziji mikoplazem,

smo uporabili v koncentracijah od 1-% do 0,0001-% raztopine. Mešanico celične suspenzije in SDS v ustreznih redčinah smo inkubirali pri sobni temperaturi in izvedli test NEAC kot je opisano v točki 3.6.2.

3.7 ANALIZA SPECIFIKE VEZAVE NA RECEPTORJE S SIALIČNO KISLINO

3.7.1 Pasji serumi, ki smo jih preiskovali na prisotnost specifičnih protiteles

S klinike za male živali Veterinarske fakultete v Ljubljani (dr. Nataša Tozon) smo prejeli več kot 40 vzorcev pasjih serumov, ki so predstavljeni v preglednici 8.

Preglednica 8: Seznam uporabljenih pasjih serumov za teste HI, HAD, IIPA in desializacije.

Table 8: List of dog sera used for HI, HAD, IIPA and desialylation tests.

Ime seruma	Podatki o živali	Razno
Serumi vojaških psov VP1-VP27	Vzorci serumov odvzeti živalim na PCR pozitivnih za pasje mikoplazme	Delovni psi, Kočevska reka, vzorci zbrani leta 2009
Serumi ovčarskih psov OP1-OP7	NP*	Delovni psi ovčarji, vzorci zbrani leta 2013
Larissa	Slovenija	Berčič in sod., 2012
Luna	Slovenija	Berčič in sod., 2012
Arlette	NP	
Pax	NP	
Lili	NP	
1405	Avstrija	Doniral J. Spergser
325	Avstrija	Doniral J. Spergser
9F11	NP	
2-5 F1	NP	

* NP – ni podatka

S testom DIBA smo preverili, ali serumi vsebujejo protitelesa, ki reagirajo s površinskimi antigeni celic pasjih mikoplazem. Na membrano Immobilon-P smo nanesli različne redčitve celic *M. canis* Larissa, *M. cynos* 896 in *M. molare* H542^T (od 1 : 100 do 1 : 1600). Membrano smo inkubirali v pasjih serumih redčenih 1 : 100. Za detekcijo smo uporabili kunčja protitelesa proti pasjim IgG, označena s HRP (A6792, Sigma, ZDA) redčena 1 : 2000 in substrat TrueBlue.

3.7.2 Testi desializacije glikoproteinov

Test desializacije smo izvedli s kompletom reagentov DIG Glycan Differentiation Kit (Roche, ZDA). Na membrano PVDF smo nanesli različno redčene vzorce pasjih

mikoplazem ter kontrolna glikoproteina fetuin in transferin in izvedli detekcijo z aglutininoma SNA (*Sambucus nigra*) in MAA (*Maackia amurensis*) po navodilih proizvajalca. Želeli smo preveriti, ali so tudi v drugih bioloških vzorcih prisotni glikoproteini, ki imajo vezano sialično kislino s sia $\alpha(2,3)$ galaktozno vezjo (MAA) ali sia $\alpha(2,6)$ galaktozno vezjo (SNA) ter ali so mikoplazme sposobne sialično kislino odcepiti s površine glikoproteinov.

Celice *M. cynos*, *M. canis* in *M. molare* smo preko noči inkubirali s kontrolnima glikoproteinoma (transferin, fetuin) v razmerju 1 : 1 na 37°C. Naslednji dan smo mešanico centrifugirali in za nadaljnje poskuse uporabili supernatant. Vzorce smo v različnih redčitvah nanesli na membrano Immobilon-P in jih inkubirali po navodilih proizvajalca v SNA in/ali MAA probi. S priloženimi označenimi protitelesi in substratom smo preverili ali je v vzorcih prišlo do odcepljanja sialične kisline in kakšna je specifika cepljenja.

Vzorce kontrolnih glikoproteinov inkubirane skupaj s celicami mikoplazem smo naložili tudi na SDS-PAGE gel. Proteine smo prenesli na membrano Immobilon-P in z uporabo reagentov DIG Glycan preverjali ali je prišlo do desializacije na nivoju posameznih proteinov, ločenih na poliakrilamidnem gelu.

3.8 HEMAGLUTINACIJA IN INHIBICIJA HEMAGLUTINACIJE

Da bi pokazali, da imajo pasje mikoplazme funkcionalen protein hemaglutinin, smo uporabili test hemaglutinacije (HA). Po centrifugiranju tekoče kulture (10 min pri 12000×g) smo celično usedljeno mikoplazem ustrezzo redčili (1 : 100) ter pripravili serijske dvojne redčitve v mikrotiterski plošči s 96 luknjami in U-oblikovanim dnom. 50 µl ustrezne redčitve celic smo dodali 50 µl 1%-raztopine eritrocitov v fiziološki raztopini (8,766 g NaCl (Merck, Nemčija) smo resuspendirali v 1000 ml destilirane vode, umerili pH na 7,4 po potrebi pa tudi avtoklavirali 15 minut pri 121 °C) in ploščo inkubirali 60 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo odčitali pozitiven oz. negativnen rezultat glede na odsotnost ali prisotnost 'gumba' v luknjicah plošče. Hemaglutinacijski titer smo določili kot najvišjo redčitev mikoplazemskih celic, pri kateri je še prišlo do hemaglutinacije, torej je reakcijska mešanica ostala motna in se eritrociti niso posedli na dno luknjice. Pri teh redčitvah so vzorci vsebovali 1 hemaglutinacijsko enoto (Rhoades, 1985). Testirali smo tudi supernatant kulture, ki je čez noč rastla v tekočem gojišču brez proteinov visokih molekulskih mas (glej točko 3.5.3.), in sicer z začetno redčitvijo 1 : 5.

Test smo izvajali s pasjimi in kokošjimi eritrocite, testirali pa smo tudi človeške, mišje, kunčje, konjske in kravje eritrocite.

S testom inhibicije hemaglutinacije (IH) smo dokazovali prisotnost protiteles, ki prepoznavajo in se vežejo na protein hemaglutinin in s tem onemogočajo vezavo eritrocitov. Prisotnost protiteles proti hemaglutininu smo preverjali v serumih psov, ki so večinoma kazali znake okužbe s pasjimi mikoplazmami (vzorci serumov zbrani na Veterinarski fakulteti Ljubljana, Klinika za male živali, preglednica 8). 60 minut smo pri sobni temperaturi inkubirali 4 hemaglutinacijske enote antiga (celični pelet *M. canis* ali *M. cynos*) in ustrezno redčitev seruma (serijske dvojne redčitve). Po 60 minutah smo v luknjico dodali 50 µl eritrocitov in inkubirali nadaljnjih 60 minut, nato pa odčitali rezultat. Prisotnost hemaglutinacijskega 'gumba' je dokaz prisotnosti protiteles proti hemaglutininu v preiskovanih tekočinah.

3.8.1 Določanje lokacije hemaglutinina na kolonijah *M. canis* in *M. cynos*

Z uporabo posrednega imunoperoksidaznega testa (IIPA, angl. indirect immunoperoxidase assay) smo želeli določiti lokacijo hemaglutinina na kolonijah *M. cynos* (Benčina in Bradbury, 1991). Izrezali smo bloke agarja na katerih so bili kolonije mikoplazem, velikosti 0,5 x 0,5 cm, ki smo jih 1 uro inkubirali v specifičnih mišjih protitelesih 5G2 proti hemaglutininu HapA *M. cynos* oz. v mišjih protitelesih 3E3 proti hemaglutininu *M. canis*. Po spiranju blokov s pufrom PBS je sledila enourna inkubacija v kozjih protitelesih proti mišjim IgG označenih s HRP. Na bloke agarja smo po končnem spiranju nanesli substrat TrueBlue, nato smo bloke obrnili in prenesli na objektno stekelce. Obarvanje kolonij smo spremljali z invertnim mikroskopom Nikon Eclipse TE2000-U.

3.8.2 Hemadsorpca

S testom hemadsorpcije smo preverjali ali so nativne kolonije *M. canis* in *M. cynos* sposobne vezati kokošje in pasje eritrocite. Izrezali smo bloke agarja na velikosti 0,5 x 0,5 cm, na katerih je bilo 100 ali več kolonij mikoplazem. Te smo prelili z 1%-raztopino svežih kokošjih ali pasjih eritrocitov in inkubirali eno uro pri sobni temperaturi. Odvečne eritrocite smo sprali s PBS, bloke obrnili in prenesli na objektno stekelce in preverili vezavo eritrocitov z invertnim mikroskopom Nikon Eclipse TE2000-U.

4 REZULTATI

4.1 NEVRAMINIDAZA *M. canis* IN *M. cynos*

Encim nevraminidaza predstavlja pomemben dejavnik patogenosti pri številnih mikroorganizmih in virusih. Že Berčič in sodelavci (2012) so dokazali, da imajo *M. canis*, *M. cynos* in *M. molare* nevraminidazno aktivnost in v encimogramu s kromogenim substratom BIN identificirali domnevne proteine z nevraminidazno aktivnostjo. V naši raziskavi smo podrobnejše preučili nevraminidazno aktivnost večih sevov pasjih mikoplazem. Določili smo nukleotidno in aminokislinsko zaporedje nevraminidaze *M. canis* in *M. cynos* ter pogledali, kako se ta zaporedja razlikujejo med sevi iste vrste. Ker nas je zanimalo tudi njeno delovanje, smo preverili kako učinkovito odceplja sialično kislino iz glikoproteinov in, ali je nakazana specifika odcepljanja glede na vrsto vezave sialične kisline.

4.1.1 Analiza nevraminidazne aktivnosti

Pri različnih kulturah pasjih mikoplazem smo testirali, ali te posedujejo nevraminidazno aktivnost. Za testiranje smo uporabili kromogeni substrat BIN, kot je opisano v poglavju 3.6. Aktivna nevraminidaza substrat cepi tako, da pride do spremembe obarvanosti testne raztopine. Sprememba barve iz brezbarvne v modro predstavlja pozitivno reakcijo (slika 7). Nevraminidazna aktivnost se razlikuje med sevi iste vrste in celo med kloni istega seva (preglednica 9, slika 8).

Pri *M. cynos* so razlike v nevraminidazni aktivnosti med sevi manjše kot pri *M. canis*. Nevraminidazna aktivnost pri *M. canis* LV ni prisotna, to pa se ujema z dejstvom, da je gen za nevraminidazo pri tem sevu prekinjen in skrajšan (v genomu *M. canis* LV NZ_CP011368.1 obsega le 2163 bp, od 623813 do 625975 bp), kar verjetno negativno vpliva na izražanje funkcionalnega proteina.

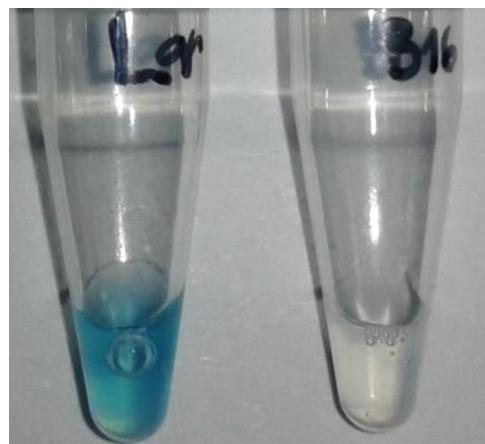
Preglednica 9: Pregled nevraminidazne aktivnosti pri različnih kulturah in sevih pasjih mikoplazem.
Table 9: Neuraminidase activity in different canine mycoplasmas and their strains.

Kultura		Redčitev	NEAC^a	Čas
<i>M. cynos</i> H831 ^T	celice	1 : 10	+++	5 min
<i>M. cynos</i> 896	celice	1 : 10	+++	20 min
	supernatant ^b	neredčen	+	čez noč
<i>M. cynos</i> 105	celice	1 : 10	+++	5 min
<i>M. cynos</i> 2297	celice	1 : 10	+++	10 min
<i>M. cynos</i> 248	celice	1 : 10	+++	15 min
<i>M. cynos</i> 2002	celice	1 : 10	+++	20 min
<i>M. cynos</i> 2716	celice	1 : 10	+++	10 min
<i>M. cynos</i> 1334	celice	1 : 10	+++	5 min
<i>M. canis</i> PG14 ^T -a	celice	1 : 10	+++	15 min
<i>M. canis</i> PG14 ^T -b	celice	1 : 10	+++	25 min
<i>M. canis</i> Larissa	celice	1 : 10	+++	5 min
	tekoča kultura	neredčena	+	čez noč
	supernatant ^b	neredčen	+	čez noč
<i>M. canis</i> UF 31	celice	1 : 10	-	
<i>M. canis</i> UF 33	celice	1 : 10	+++	15 min
<i>M. canis</i> UF G1	celice	1 : 10	+++	10 min
<i>M. canis</i> UF G4	celice	1 : 10	+	čez noč
<i>M. canis</i> LV	celice	1 : 10	-	/
<i>M. canis</i> B16/08	celice	1 : 10	+	čez noč
<i>M. molare</i> H542 ^T	celice	1 : 5	+++	15 min
<i>M. edwardii</i> PG24 ^T	celice	1 : 10	-	/

^aReakcija NEAC: -, ni nevraminidazne aktivnosti; + zelo šibka NEAC (razvoj barve čez noč); ++ šibka NEAC (razvoj barve do 2 uri); +++ močna NEAC (do 30 minut)

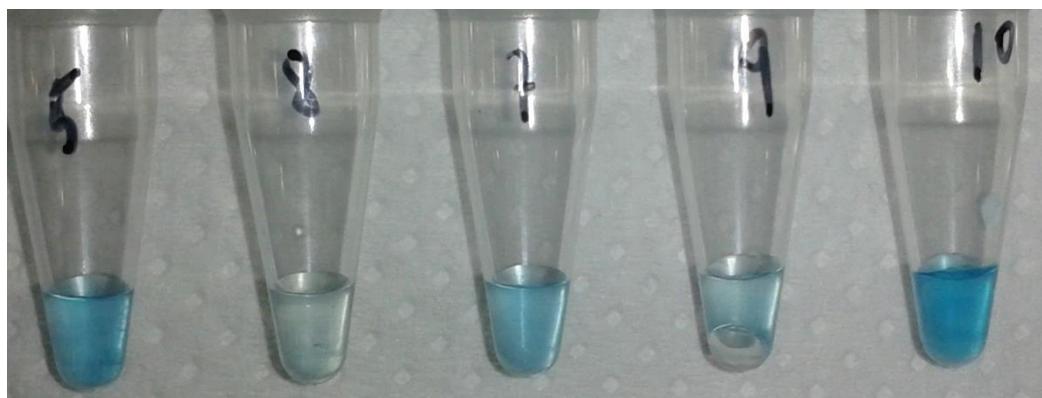
^b Supernatant tekoče kulture (po centrifugiraju), ki domnevno vsebuje nevraminidazo odpuščeno s površine mikoplazemskih celic

Pri ptičjih mikoplazmah je višja NEAC povezana z višjo invazivnostjo (May in sod., 2007) in podobna slika se kaže tudi v naši raziskavi, saj *M. cynos* povzroča izrazitejše zdravstvene težave. Pri nekaterih kulturah višjih pasaž je prihajalo do pojava, da je NEAC postajala manj izrazita (*M. canis* PG14^T). Prav tako je prišlo do razlik v NEAC pri klonih kulture *M. cynos* 105. S presajevanjem posameznih kolonij smo pridobili 5 klonov seva 105, pri katerih smo testirali NEAC. Ugotovili smo, da se ta med kloni razlikuje. K5 in K10 sta imela močno NEAC z obarvanjem že po 5 minutah, pri klonih K7 in K9 je razvoj barve trajal približno 30 minut, medtem ko se je pri K8 barva razvila šele preko noči. Rezultati so prikazani na sliki 9. Seva *M. cynos* 105 in *M. canis* Larissa sta sicer imela NEAC primerljivo z delovanjem nevraminidaze *C. perfringens*, ki smo jo uporabili kot pozitivno kontrolo.



Slika 7: Izvedba testa določanja nevraminidazne aktivnosti. Prikazan je razvoj modregaobarvanja reakcijske raztopine, ki vsebuje celice mikoplazem redčene 1 : 10 in kromogeni substrat BIN, ki ga aktivna nevraminidaza cepi in povzroči spremembo barve reakcijske mešanice. Na levi je prikazan sev *M. canis* Larissa, ki je imel močno NEAC reakcijo že po 5 minutah. Na desni je sev *M. canis* B16/08 z zelo šibko NEAC, pri katerem je do razvoja barve prišlo šele čez noč.

Figure 7: Determination of neuraminidase enzymatic activity. Reaction mixture contains mycoplasma cells in 1 : 10 dilution and chromogenic substrate BIN. Active neuraminidase can cleave BIN and causes a change in colour from transparent to blue. On the left side is *M. canis* Larissa with strong NEAC. A change in colour occurred after 5 minutes. On the right side is *M. canis* B16/08, that did not show NEAC in the same time frame, but only after overnight incubation of the reaction mixture.



Slika 8: Prikaz razlik NEAC pri klonih *M. cynos* 105. K5 in K10 sta se močno obarvala ob dodatku substrata BIN-a, reakcija je potekla v 5 minutah. Najpočasnejši razvoj barve smo spremljali pri klonu K8, kjer je prišlo do pojave močnega obarvanja šele čez noč.

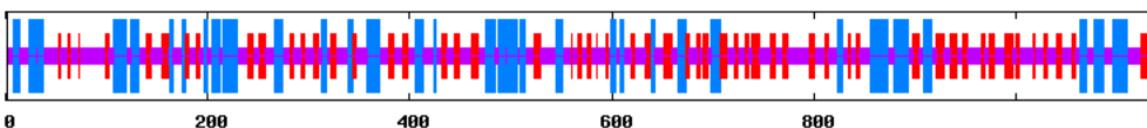
Figure 8: Differences in NEAC in clones of the same culture, *M. cynos* 105. K5 and K10 reacted to BIN in 5 minutes, whereas in K8 the colour developed only after overnight incubation.

4.1.2 Določanje nukleotidnega in aminokislinskega zaporedja nevraminidaze sevov *M. canis*

Berčič in sodelavci (2012) so pokazali, da ima *M. canis* Larissa močno nevraminidazno aktivnost in protein velik približno 130 kDa, ki je v encimogramu reagiral s substratom BIN. Tudi pri sevu PG14^T so pokazali obstoj tega proteina, kljub temu, da ima ta sev

približno petkrat nižjo nevraminidazno aktivnost kot Larissa. V sekvenciranem genomu PG14^T (Brown in sod., 2012) je anotiran gen za sialidazo (nevraminidazo) pod oznako MCANPG14_00438. Na podlagi tega zaporedja smo pripravili začetne oligonukleotide s katerimi smo pomnožili gen za nevraminidazo pri slovenskem izolatu Larissa, ki ima visoko NEAC ter del zaporedja pri sevih B16/08 in 155547. Gen za nevraminidazo *M. canis* Larissa je dolg 3414 baznih parov, tako kot nevraminidaza tipskega seva PG14^T.

Na podlagi določenega nukleotidnega zaporedja smo z bioinformacijskim orodjem ExPASy Translate Tool (Gasteiger in sod., 2003) pridobili tudi aminokislinsko zaporedje proteina nevraminidaze *M. canis* Larissa. Glede na podatke, pridobljene z bioinformacijskim orodjem ExPASy ProtParam (Gasteiger in sod., 2003), ima nevraminidaza *M. canis* Larissa 1137 aminokislin, molekulsko maso 131,7 kDa in izoelektrično točko pI 5,96. Podatek o molekulski masi, sicer preračunan iz mase posameznih aminokislinskih ostankov, se ujema z eksperimentalnimi podatki iz literature (Berčič in sod., 2012). Aminokislinsko zaporedje seva Larissa se od zaporedja tipskega seva razlikuje v devetih aminokislinah (priloga D). Z orodjem GOR IV secondary structure prediction tool (Garnier in sod., 1996) smo napovedali sekundarno strukturo proteina (slika 9). Četrtnino strukture zaporedja proteina sestavljajo α -vijačnice (24,63 %), četrtnino β -ravnina (24,19 %), preostanek pa zavzemajo elementi naključnega klobčiča (51,19 %).



Slika 9: Grafični prikaz sekundarne proteinske strukture nevraminidaze *M. canis* Larissa. Algoritem GOR IV secondary structure prediction tool na podlagi aminokislinskega zaporedja določi odstotek in razporeditev elementov sekundarne strukture. Legenda: ■ - α -vijačnica; ■ - iztegnjena veriga β -ravnine; ■ - naključni klobčič.

Figure 9: Graphical representation of secondary protein structure in *M. canis* Larissa neuraminidase protein. Based on aminoacid sequence the GOR IV secondary structure prediction tool determines the percentage and distribution of secondary structure elements. Legend: ■ - α -helix; ■ - β -sheet extended strand; ■ - random coil.

S pomočjo programa TMHMM Server 2.0 (Sonnhammer in sod., 1998) smo napovedali, da je nevraminidaza *M. canis* Larissa membranski protein, katerega večina aminokislin je orientiranih na zunanjji strani membrane (prvih 6 aminokislin se nahaja na citosolni strani, aminokisline 7-29 se raztezajo preko membrane, preostali del proteina pa se nahaja na zunanjji strani). To se ujema z našimi opažanji, da je nevraminidaza membransko vezan protein, ki se s površine celice odpušča v okoliški medij (gojenje celic v gojišču s proteinimi nizkih molekulskih mas).

4.1.3 Določanje nukleotidnega in aminokislinskega zaporedja nevraminidaze sevov *M. cynos*

Tudi za *M. cynos* so Berčič in sod. (2012) v encimogramu pokazali, da ima nevraminidazo, ki je velika približno 105 kDa. V genomu *M. cynos* C142 (Walker in sod., 2013) je gen za nevraminidazo anotiran pod oznako MCYN_RS01800 (celoten gen). Na podlagi tega zaporedja smo pomnožili gen za nevraminidazo pri *M. cynos* sevih H831^T, 896, 105, 2296 in 2297. Podatki o lastnostih genov in proteinov za nevraminidaze sevov *M. cynos* so prikazani v preglednici 10.

Preglednica 10: Pregled sorodnih genov za nevraminidazo *M. cynos* in pomembnih biokemijskih lastnosti pripadajočih proteinov.

Table 10: List of related *M. cynos* genes for neuraminidase and main biochemical protein characteristics.

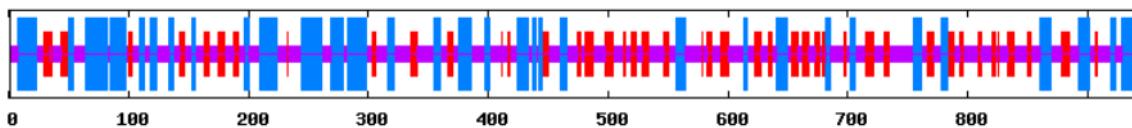
Sev <i>M. cynos</i>	Dolžina gena [bp]	Dolžina proteina	Teoretična molekulská masa [kDa]	pI	Identifikacijska številka GenBank
C142 ^a	2832	943 a.k.	108,4	9,19	MCYN_RS01800
H831	2835	944 a.k.	108,4	9,19	KX827422
896	2835	944 a.k.	108,5	9,20	KX827425
105	2835	944 a.k.	108,5	9,12	KX827421
2296	2835	944 a.k.	108,5	9,26	KX827423
2297	2835	944 a.k.	108,3	9,06	KX827424

^a – nukleotidno in aminokislinsko zaporedje že predhodno določeno (Walker in sod., 2013)

Za pridobitev podatkov o teoretični molekulski masi in izoelektrični točki smo uporabili bioinformacijsko orodje ExPASy ProtParam. Protein *M. cynos* C142 ima glede na ostala določena zaporedja eno aminokislino manj. Proteini imajo bazično izoelektrično točko, njihova molekulská masa pa se ujema s podatki iz literature (Berčič in sod., 2012). Poravnava vseh določenih aminokislinskih zaporedij se nahaja v Prilogi E.

Za aminokislinsko zaporedje tipskega seva *M. cynos* H831^T smo napovedali sekundarno strukturo proteina z orodjem GOR IV secondary structure prediction tool (slika 10). 28,92 % strukture zaporedja proteina sestavlja α-vijačnice, dobro petino β-ravnina (21,19 %), preostanek pa zavzemajo elementi naključnega klobčiča (49,79 %).

S programom TMHMM Server 2.0 smo napovedali, da je tudi nevraminidaza *M. cynos* H831^T membransko vezan protein, katerega večji del je lociran na zunanjih strani celice. Na citosolni strani celice se nahaja prvih 86 aminokislin (z N-terminalnega konca), aminokisline 87-106 se raztezajo preko membrane, ostanek proteina pa je lociran na zunanjih strani celice.



Slika 10: Grafični prikaz sekundarne proteinske strukture nevraminidaze *M. cynos* H831^T. Algoritem GOR IV secondary structure prediction tool na podlagi aminokislinskega zaporedja določi odstotek in razporeditev elementov sekundarne strukture. Legenda: - α -vijačnica; - iztegnjena veriga β -ravnine; - naključni klobčič.

Figure 10: Graphical representation of secondary protein structure in *M. cynos* H831^T neuraminidase protein. Based on aminoacid sequence the GOR IV secondary structure prediction tool determines the percentage and distribution of secondary structure elements. Legend: - α -helix; - β -sheet extended strand; - random coil.

Nevraminidazi *M. canis* in *M. cynos* vsebujeta v aminokislinskem zaporedju strukturne motive, značilne tudi za številne druge nevraminidaze. Prisoten je moti RIP, ki predstavlja aktivno mesto proteina ter več motivov Asp škatle (glej tudi prilogi D in E).

```

MNNILNFIKQASVKIYINIKVFQNLNTKIKILCSKISAGFKWTYQSIIINTKSLHSKLN
NSKTKAQFVILKDKIVAKTQAKHTKKILVTSLLLISASALVIISVFTTRSILLQNSIDIS
SKEQKSNISETPKLISIEDGAKYEVSSSYKNYEYDIKNLPKIKVEIIDSNNEVFYSEIG
IIDPDKTKTIIIFKLDNLPLKLDKLFTNSNYTLRLIKNLEARKDIADSSLNNIILGPIFT
LDFSKSFASLYEKNYVLMNLSIENIFKIPPTYALLKKVIKENYLPEQKEKIEQQLLDLVNK
NYKSVLESNDIDLGDKELEVLIKLSDNKEHQDFYESDIYYFILNNKTIQQQNQTNDPEAILL
SNKDKSIQFTITKDPFI SANKLGKAIQNNKFDIKRLSSETLFGHKEDGANTYRIEIIKL
KNGTLIANADKRYQNFRDYFNNITQAIKE SYDNGRTWTNPREILKVQI PSLKNQGLTIDG
TMIEVEYFENVSNKKGTKLLFFVDIFPDKTGLPHLHNGTIWTKINGKNYRLYTRLKSND
KFDDEISFLERVPGTQNWFRRVILKAGKDINKATSSDFTLTSDYVDLNYHTETSAITGIV
YKNIQSESELNNPEVLQSKKTEYSVLDFANNNKSKVVLSSDEYDEVKNKKKTGKLLAFN
NHVVSIE SYDNGKTWNLRWIDEVYESSNAFKSGTAVGNPIQLKHQKDPKLNGRILLP
MYQIGGGGLPAYYLYSDDYGNSTWKRQNVSFPRNLTESSMIEAKDGSIYWLLRNDRGFGAA
TAKHWITK SVDGGKTW INPNNGDTGSNGKDLNIGNKFDGNVFSGIGYFNLKGKDYFIFI
AKDNIRRNGSLFITDSTFNDATELFDYDFMLNQGNKNEHFVYSYALTIDEEKDYVDILSI
YEASEKTRVHGKPNGDGLPEWEKRPQADEIQVDRFRIWLKDQK

```

Slika 11: Prikaz značilnih motivov v aminokislinskem zaporedju nevraminidaze *M. cynos* H831^T. Z vijoličnim okvirjem je označen RIP motiv (X-R-X-P), ki predstavlja aktivno mesto encima. Z modrimi okvirji so označeni motivi Asp škatle (S-X-D-X-G-X-T/(S)-W).

Figure 11: Graphical representation of typical structural motifs in the aminoacid sequence of *M. cynos* H831^T. The violet box indicates the position of RIP motif (X-R-X-P), enzymes active site. Blue boxes indicate the position of Asp box structural motif (S-X-D-X-G-X-T/(S)-W).

4.1.4 Testi desializacije glikoproteinov

Testirali smo pasje serume, ki smo jih prejeli s Klinike za male živali Veterinarske fakultete v Ljubljani. Pasji serumi so bili odvzeti ob sumu na okužbe s pasjimi mikoplazmami, ob ponavljajočih kliničnih okužbah ali pa skupinam psov, ki živijo skupaj (preglednica 8). Najprej smo preverili ali serumi vsebujejo protitelesa, ki prepoznavajo

antigenske determinante na površini mikoplazemskih celic. Preliminarno smo izvedli test DIBA, rezultati so prikazani na sliki 12.



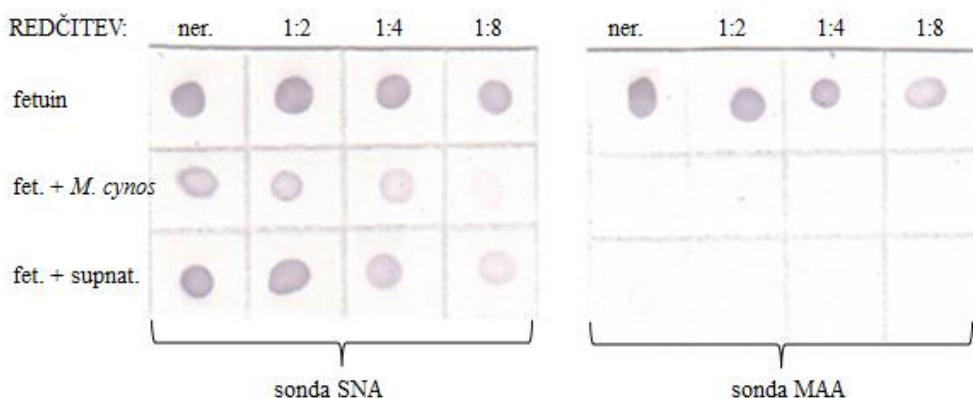
Slika 12: Test pasjih serumov na vsebnost protiteles proti pasjim mikoplazmam. Na membrani Immobilon-P so nanešene celice *M. cynos* 105, *M. canis* Larissa in *M. molare* H542^T, redčene 1 : 1000. Membrano smo namakali v pasjih serumih redčenih 1 : 100.

Figure 12: Dog sera contain antibodies against cells of canine mycoplasmas. Cells of *M. cynos* 105, *M. canis* Larissa and *M. molare* H542^T diluted 1 : 1000 were applied onto Immobilon-P membrane and incubated in different dog sera, diluted 1 : 100.

Rezultati DIBE nakazujejo, da so v serumih prisotna specifična protitelesa, ki prepoznavajo antigenske determinante celic pasjih mikoplazem. Pri serumu Larissa je bila reakcija najmočnejša pri *M. canis*, kar je v skladu z dejstvom, da je bil sev izoliran iz brisa vagine te psice. Na podlagi rezultatov tega testa ne moremo pojasniti, ali so reakcije z več različnimi sevi res posledica različnih okužb živali ali pa mogoče prihaja do navzkrižne reaktivnosti z molekulami, ki si med sevi delijo antigenske determinante. Reakcije so bile prisotne tudi, če smo antigen redčili do 1 : 1600 (ni prikazano), kar potrjuje, da celice mikoplazem vsebujejo na svoji površini molekule, ki so za okužene pse močno imunogene.

Z uporabo kontrolnega glikoproteina fetuina (iz kompleta reagentov DIG Glycan) smo preverili ali *M. canis* in *M. cynos* lahko odcepita sialično kislino, ki je vezana na molekuli fetuina. Fetuin namreč v svoji strukturi vsebuje sialično kislino vezano preko $\alpha(2,3)$ in $\alpha(2,6)$ vezi na galaktozo (Baenziger in Fiete, 1979). Celice mikoplazem smo čez noč

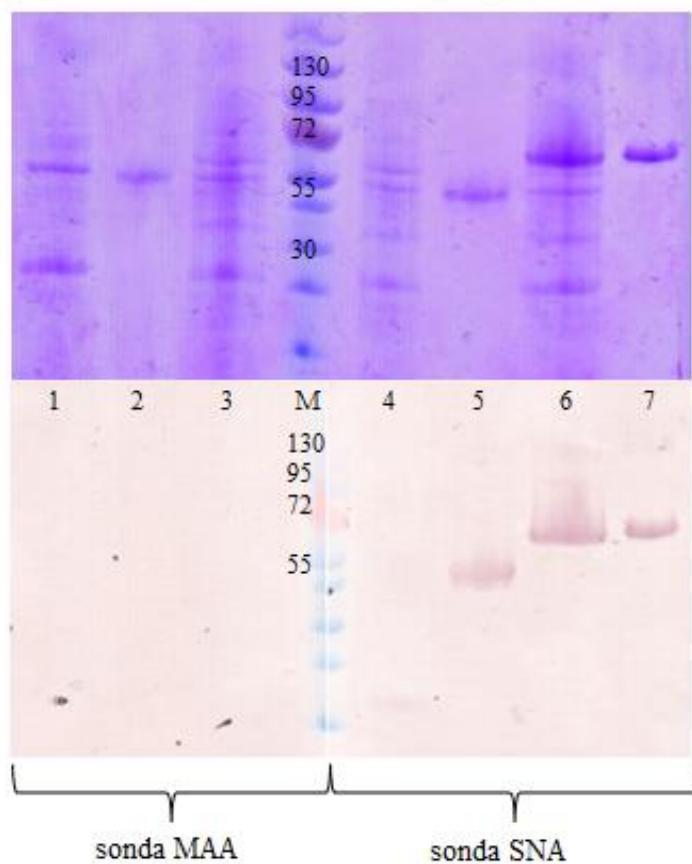
inkubirali skupaj s fetuinom. Ugotovili smo, da *M. canis* in *M. cynos* učinkovito odcepita sialično kislino, ki je vezana preko $\alpha(2,3)$ vezi (proba MAA, slika 13), odcepljanje sialične kislino vezane preko $\alpha(2,6)$ vezi pa ni bilo učinkovito. Nasprotno pa *M. molare* učinkovito cepi tudi sialično kislino vezano z $\alpha(2,6)$ vezjo (ni prikazano).



Slika 13: *M. cynos* odceplja sialično kislino, ki je na fetuin vezana preko $\alpha(2,3)$ vezi. V testu DIBA smo uporabili kontrolni glikoprotein fetuin (komplet reagentov Dig Glycan), ki smo ga čez noč inkubirali s celicami *M. cynos* 105 ali brezceličnim supernatantom te kulture. Na membrano Immobilon-P smo nanesli fetuin, supernatant inkubacijske mešanice fetuina in celic seva 105 ter fetuin, ki je bil inkubiran skupaj z brezceličnim supernatantom iste kulture. Preverili smo sposobnost odcepljanja sialične kislino vezane preko $\alpha(2,6)$ vezi (sonda SNA, levo) ali preko $\alpha(2,3)$ vezi (sonda MAA, desno).

Figure 13: *M. cynos* can cleave sialic acid bound to fetuin via $\alpha(2,3)$ bond. Reference glycoprotein fetuin (DIG Glycan kit) was incubated overnight with *M. cynos* 105 cells and cell-free supernatant. Samples of fetuin, supernatant of cell+fetuin mixture and fetuin incubated with cell-free supernatant were bound to Immobilon-P membrane. Ability to cleave sialic acid was tested using SNA probe (left) for $\alpha(2,6)$ bond or MAA probe (right) for $\alpha(2,3)$ bond.

Vzorce transferina in fetuina, inkubirane čez noč s celicami *M. cynos* 105, smo ločili na poliakrilamidnem gelu in preverili ali je prišlo do desializacije. Transferin, ki ima sialično kislino vezano z $\alpha(2,6)$ vezjo ni bil cepljen, medtem ko je nevraminidaza *M. cynos* odcepila sialično kislino vezano preko $\alpha(2,3)$ vezi s fetuina (slika 14).



Slika 14: Desializacija kontrolnih glikoproteinov fetuina in transferina. 1, brezcelični supernatnat *M. cynos* 105; steza 2 in 5, fetuin; steza 3 in 4, fetuin inkubiran z brezceličnim supernatantom seva 105; steza 6, transferin inkubiran z brezceličnim supernatantom seva 105; 7, transferrin; M, velikostni standard (Thermo Fisher Scientific). Zgoraj je prikazan poliakrilamidni gel obarvan z barvilm Comassie, spodaj pa proteini preneseni na membrano Immobilon-P. Za detekcijo so bili uporabljeni reagenti DIG Glycan s sondama MAA (levo) in SNA (desno).

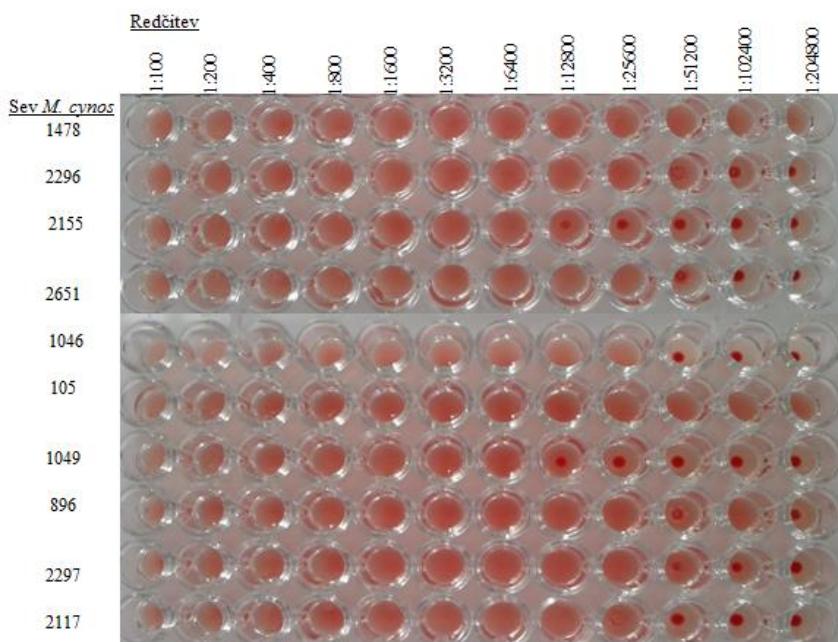
Figure 14: Desialylation of reference glycoproteins fetuin and transferrin. 1, cell-free supernatant of *M. cynos* 105; 2 and 5, fetuin; 3 and 4, fetuin incubated overnight with cell-free supernatant of *M. cynos* 105; 6, transferrin incubated overnight with cell-free supernatant of *M. cynos* 105; 7, transferrin; M, prestained proteins of the molecular mass marker (Thermo Fisher Scientific). On the upper panel is polyacrylamid gel stained with Coomassie, on the lower the proteins transferred to Immobilon-P membrane. Detection was done using reagents of DIG Glycan Kit with probes MAA (left) and SNA (right).

4.2 IDENTIFIKACIJA IN KARAKTERIZACIJA HEMAGLUTININA HapA *M. cynos*

Kot je to značilno za nekatere druge vrste mikoplazem (*M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. meleagridis*) smo želeli ugotoviti ali imajo tudi pasje mikoplazme gen za hemaglutinin in tvorijo ustrezni proteinski produkt. Kot prvi smo v naši raziskavi identificirali in opisali hemaglutinin HapA *M. cynos* (Kastelic in sod., 2015).

4.2.1 Hemaglutinacijska sposobnost *M. cynos*

Pri vseh 18 sevih *M. cynos* izoliranih iz različnih organov (preglednica 3) smo testirali sposobnost hemaglutinacije eritrocitov različnih živalskih vrst, kot je opisano v točki 3.8. Vsi sevi so bili sposobni hemaglutinacije (slika 15), titri so se gibali od 1 : 4000 do 1 : 200000 za hemaglutinacijo s pasjimi ali kokošjimi eritrociti. Sposobnost hemaglutinacije variira od seva do seva, upada s starostjo kulture in po daljšem shranjevanju oz. večjem številu ciklov odtajevanja in ponovnega zamrzovanja celic.



Slika 15: HA različnih sevov *M. cynos*. Na sliki je predstavljen rezultat testa HA s celicami različnih sevov *M. cynos* in kokošjimi eritrociti. Redčitev celic v prvi luknji mikrotiterske plošče je 1 : 100, sledijo serijske dvojne redčitve. HA titri se med posameznimi sevi močno razlikujejo.

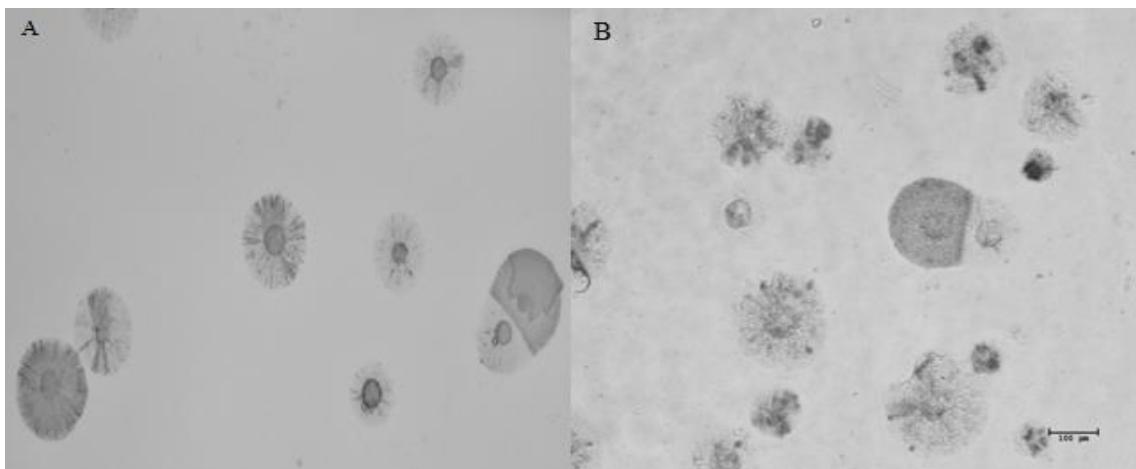
Figure 15: Haemagglutination ability of different *M. cynos* strains. Different *M. cynos* strains were tested for their ability to haemagglutinate chicken erythrocytes. Initial dilution of cell pelets was 1 : 100 and a two-fold serial dilution was made in each line of the microtiter plate. HA titer between different strains vary a great deal.

Titri so bili višji ob uporabi pasjih in kokošjih eritrocitov, a so bile celice *M. cynos* sposobne hemaglutinirati tudi eritrocite človeka, miške, kunca, krave in konja. Titri ob uporabi kokošjih eritrocitov so bili pogosto najvišji, to pa je najverjetneje povezano tudi z njihovo fiziologijo (vsebnost jedra poveča specifično težo eritrocitov, kar povzroča boljše oz. hitrejše usedanje).

4.2.2 IIPA in hemadsorpcija (HAD) eritrocitov na nativne kolonije *M. cynos*

Sposobnost sevov *M. cynos*, da hemaglutinirajo eritrocite, je bila pozitivno povezana s sposobnostjo nativnih kolonij na agarju, da vežejo na svoji površini eritrocite. Enako kot pri HA, so bili tudi v testu HAD pozitivni vsi sevi *M. cynos*, čeprav so pri nekaterih HAD⁺ fenotip izkazovale le posamezne (redke) kolonije.

S testom IIPA in uporabo monoklonskih protiteles 5G2, ki reagirajo s hemaglutininom *M. cynos*, smo dokazali, da je hemaglutinin vezan na površini nativnih kolonij. Pri sevih 1478 in 2155 smo pokazali delno obarvanje kolonij, kar kaže na neenakomerno razporeditev hemaglutinina na površini celic (slika 16).

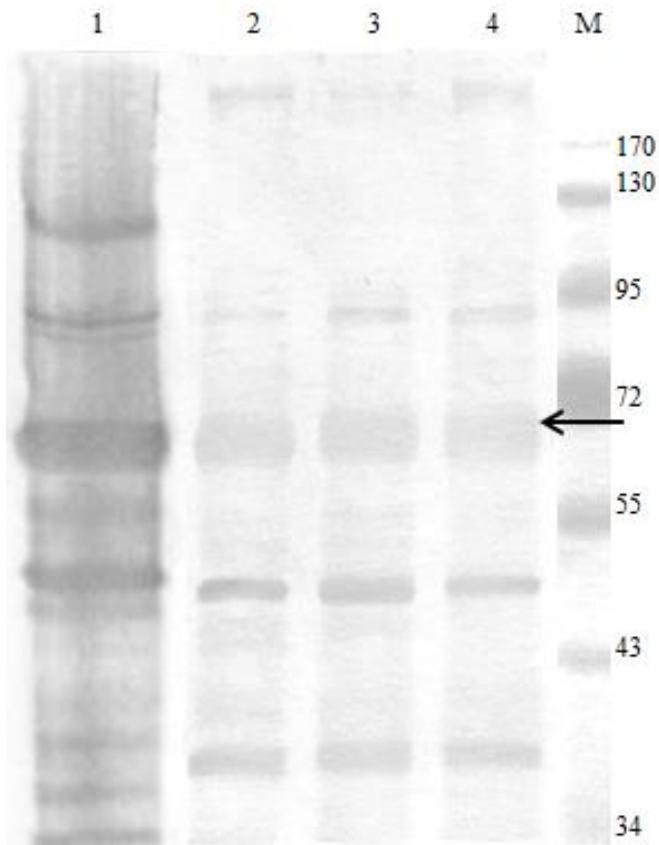


Slika 16: Reakcije monoklonskih protiteles 5G2 z nativnimi kolonijami *M. cynos* v posrednem imunoperoksidaznem testu. Protitelesi 5G2 prepoznavajo in se veže na hemaglutinin HapA *M. cynos*. a) kolonije *M. cynos* 1478; b) kolonije *M. cynos* 2155. Z monoklonskimi protitelesi je reagiral le del kolonij, tudi pri večini drugih sevov je barvanje le delno.

Figure 16: Indirect immunoperoxidase staining of native *M. cynos* colonies with monoclonal antibodies 5G2 to HapA. a) colonies of strain 1478; b) colonies of strain 2155. Only partial staining of colonies is visible, as is the case with most other strains tested.

4.2.3 Izločanje hemaglutinina v tekoče gojišče s proteini nizkih molekulskih mas

Poleg celičnih usedlin smo testirali tudi HA z brezceličnim supernatantom kultur *M. cynos* 896, 1334 in 2296, ki smo jih čez noč inkubiranih v tekočem gojišču s proteini nizkih molekulskih mas (glej 3.5.3). Supernatanti so obdržali sposobnost hemaglutinacije s titri do 1 : 5120, kar nakazuje na odpuščanje površinsko vezanega hemaglutinina s celic v gojišče. V supernatantih smo dokazali prisotnost približno 65 kDa velikega proteina, za katerega smo domnevali, da je hemaglutinin *M. cynos* (slika 17).

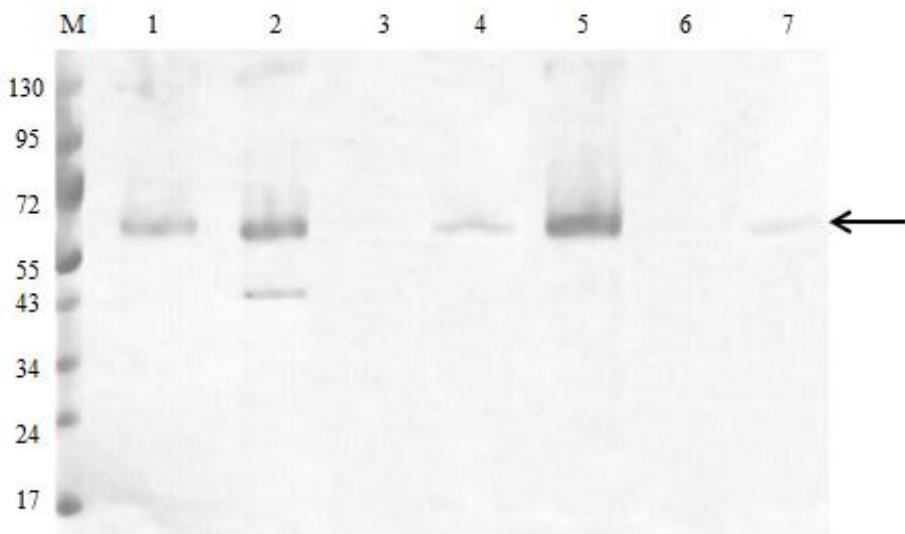


Slika 17: Analiza imunogenih proteinov *M. cynos*. Membrano PVDF smo inkubirali v mišjem serumu proti *M. cynos*, pridobljenem pri imunizaciji BALB/c miši. Steza 1, lizat celic; steze 2, 3 in 4, vzorci redčenih supernatantov (1 : 10) pridobljenih po inkubaciji treh različnih kultur *M. cynos* (896, 1334, 2296) v mediju s proteini nizkih molekulskih mas; steza M, velikostni standard (Thermo Fisher Scientific). Puščica nakazuje pozicijo proteina velikega okrog 65 kDa.

Figure 17: Western blot analysis of *M. cynos* immunogenic proteins. PVDF membrane was incubated in mouse serum anti *M. cynos* obtained from immunization of BALB/c mice. Lane 1, lysed whole cells; lanes 2, 3 and 4, samples of diluted supernatants (1 : 10) obtained from three different *M. cynos* cultures (896, 1334, 2296) after overnight incubation in low-protein medium; lane M, prestained proteins of the molecular mass marker (Thermo Fisher Scientific). The arrowhead indicates the position of a 65 kDa protein.

4.2.4 Izolacija hemaglutinina HapA preko vezave na eritrocite

Supernatant, ki je vseboval hemaglutinin sproščen s površine celic *M. cynos*, smo inkubirali s pasjimi in kokošjimi eritrociti. Receptorji na površini eritrocitov namreč vsebujejo glikoforin z vezano sialično kislino, ki predstavlja relevanten ligand za vezavo HapA. Iz supernatantov sevov 896, 1334 in 2296 smo tako preko vezave na eritrocite izolirali 65 kDa velik protein (Slika 18). Vzorci, ki so vsebovali očiščen 65 kDa protein HapA so hemaglutinirali pasje in kokošje eritrocite (titri od 1 : 40 do 1 : 320).

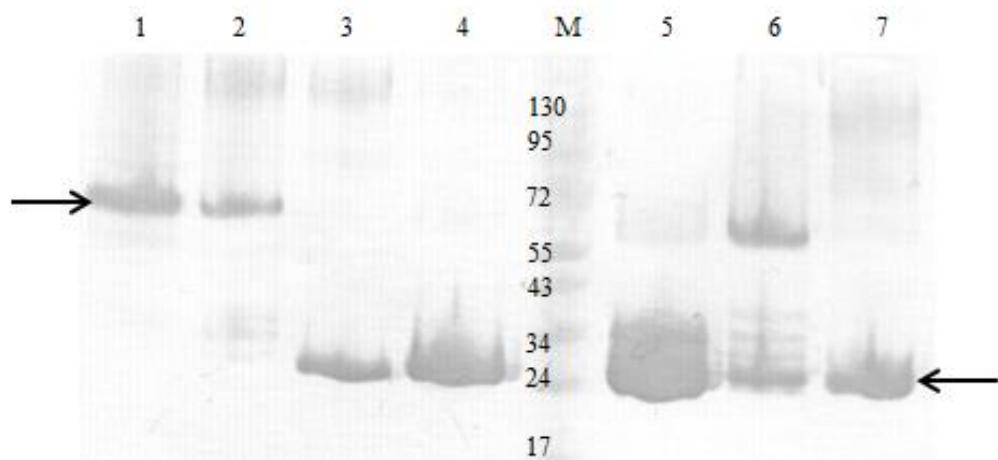


Slika 18: Dokazovanje hemaglutinina HapA *M. cynos* 896. 1, HapA izoliran preko vezave na pasje eritrocite; 2, supernatant uporabljen za izolacijo HapA; 3, lizat pasjih eritrocitov; 4, pasji eritrociti z vezanim HapA; 5, HapA izoliran preko vezave na kokošje eritrocite; 6, lizat kokošjih eritrocitov; 7, kokošji eritrociti z vezanim HapA; M, velikostni standard (Thermo Fisher Scientific). S puščico na desni je označen približno 65 kDa velik HapA.

Figure 18: Identification of *M. cynos* 896 haemagglutinin HapA. 1, HapA isolated via dog erythrocytes; 2, supernatant that contains HapA; 3, lysed dog erythrocytes; 4, HapA bound to dog erythrocytes; 5, HapA isolated via chicken erythrocytes; 6, lysed chicken erythrocytes; 7, HapA bound to chicken erythrocytes; M, prestained proteins of the molecular mass marker (Thermo Fisher Scientific). The arrow on the right side indicates an approximately 65 kDa HapA.

4.2.5 Določitev aminokislinskega zaporedja HapA in identifikacija na genetskem nivoju

65 kDa protein HapA smo ločili na poliakrilamidnem gelu (SDS-PAGE) in ga prenesli na membrano PVDF. Proteinsko liso, ki je reagirala z monoklonskimi protitelesi 5G2, smo izrezali iz membrane in poslali na Institut Jozef Stefan za določitev N-terminalnega aminokislinskega zaporedja. Z Edmanovo degradacijo nismo dobili pozitivnih rezultatov, verjetno je razlog ta, da je protein N-terminalno blokiran. Kasneje smo pri vzorcih, ki smo jih do 3 tedne hranili na 4-8 °C opazili, da prihaja do spontane degradacije 65 kDa proteina, med drugim tudi v ~25 kDa velik fragment (slika 19). Tega smo ponovno poslali na določitev N-terminalnega aminokislinskega zaporedja in dobili močan signal za 23 aminokislinskih ostankov. Zaporedje aminokislín NNEMTPKVTVEAKSMELLLSVEK pripada proteinu, ki ga v genomu *M. cynos* C142 (Walker in sod., 2013) kodira gen MCYN_RS01445 (prej MCYN_0308). Protein je domnevni lipoprotein, ki v prvi tretjini molekule vsebuje regijo bogato s prolini (PRR, angl. proline-rich region), značilno tudi za hemaglutinine *M. synoviae* in *M. gallisepticum*.

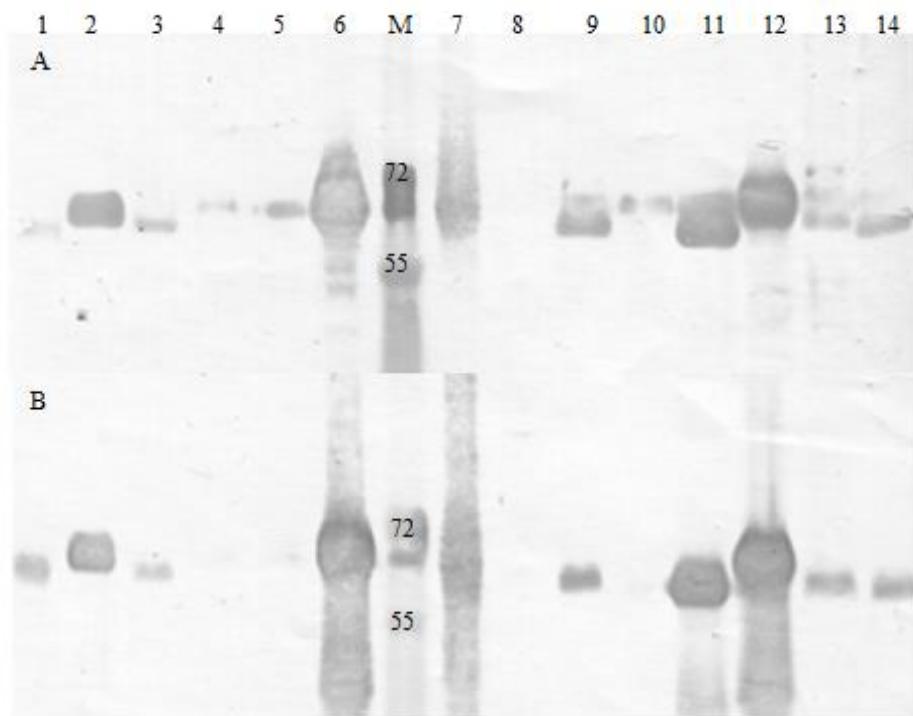


Slika 19: Analiza vzorcev *M. cynos* 896 na prisotnost HapA. 1, celični lizat, 2, supernatant I; 3, supernatant I, hranjen na 4-8°C; 4, supernatant II, hranjen na 4-8°C; M, velikostni standard (Thermo Fisher Scientific); 5, supernatant III, hranjen na 4-8°C; 6, supernatant IV; 7, supernatant V, hranjen na 4-8°C. Puščica na levi strani nakazuje na 65 kDa protein HapA. Puščica na desni kaže na fragment HapA velikosti 25 kDa, ki je bil poslan na določanje N-terminalnega aminokislinskega zaporedja.

Figure 19: Western blot analysis of HapA in different *M. cynos* 896 samples. 1, whole-cell lysate; 2, supernatant I; 3, supernatant I, stored at 4-8°C; 4, supernatant II, stored at 4-8°C; M, prestained proteins of the molecular mass marker (Thermo Fisher Scientific); 5, supernatant III, stored at 4-8°C; 6, supernatant IV and 7, supernatant V, stored at 4-8°C. The left arrowhead indicates an about 65 kDa HapA protein. The arrowhead on the right side indicates a 25 kDa fragment of HapA sent for N-terminal sequencing.

4.2.6 *hapA* podobni geni in njihova ekspresija pri različnih sevih *M. cynos*

Gen MCYN_RS01445 pripada družini sorodnih genov (v genomu seva C142 jih je okoli 20), ki nosijo zapis za lipoproteine s podobnim zaporedjem signalnih peptidov, mestom cepitve (VVA*C₁AK) ter regijo PRR. Na podlagi primerjev pridobljenih iz genskega zaporedja MCYN_RS01445 smo pomnožili *hapA* podobne gene pri 16 *M. cynos* sevih, med drugim tudi pri tipskem sevu H831^T (priloga C). Nukleotidna zaporedja so si med seboj podobna in izkazujejo od 91 do 98-% podobnost z nukleotidnim zaporedjem gena MCYN_RS01445. Seva 1049 ter 1478 imata delecijo 54 ter 24 nukleotidov, sevi H831^T, 896, 2253, 2297 in 1049 pa insercijo dolžine 21 baznih parov. Osmim sevom *M. cynos* smo določili tudi zaporedje izraženega *hapA* gena (prepis v cDNA). Tudi na proteinskem nivoju smo dokazali, da se hemaglutinin sintetizira pri številnih sevih *M. cynos* (slika 20).



Slika 20: HapA pri različnih *M. cynos* sevih. a) reakcije z monoklonskim protitelesom 3B7; b) reakcije z monoklonskim protitelesom 5G2. 1, sev 105; 2, sev 896; 3, sev 2296; 4, sev 2297; 5, sev 1046; 6, tipski sev $H831^T$; 7, rHapA; 8, sev 1334; 9, sev 1478; 10, sev 2155; 11, sev 2253; 12, sev 316; 13, sev 2651 in 14, sev 2117. M, velikostni standard (Thermo Fisher Scientific).

Figure 20: HapA in different *M. cynos* strains. a) reactions with monoclonal antibody 3B7; b) reactions with monoclonal antibody 5G2. 1, strain 105; 2, strain 896; 3, strain 2296; 4, strain 2297; 5, strain 1046; 6, type strain $H831^T$; 7, rHapA; 8, strain 1334; 9, strain 1478; 10, strain 2155; 11, strain 2253; 12, strain 316; 13, strain 2651 in 14, strain 2117. M, prestained proteins of the molecular mass marker (Thermo Fisher Scientific).

4.3 IDENTIFIKACIJA HEMAGLUTININA HacA *M. canis*

4.3.1 Hemaglutinacijska sposobnost in hemadsorbcijska *M. canis*

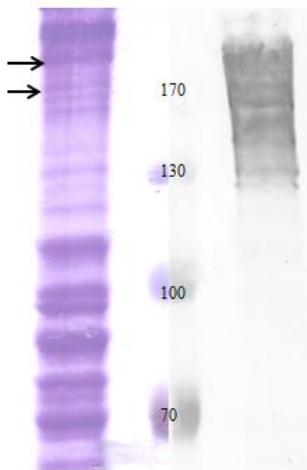
Na splošno sevi *M. canis* niso tako učinkovito hemaglutinirali eritrocite različnih živalskih vrst, kot to velja za seve *M. cynos*. Sevi so izkazovali nižje HA titre, izjema je slovenski izolat Larissa. Ta je v testih HA dosegal titre do 1 : 20480, tipski sev PG14 T pa največ komaj pol manjše titre (1 : 10240). Slovenski izolat Luna je imel hemaglutincijsko sposobnost do 1 : 400, sev UF G1 prav tako, vsi ostali sevi pa so bili hemaglutinacijsko negativni, saj so bili titri nižji od 1 : 100. Sposobnost hemaglutinacije s starostjo kulture oz. s podaljšanim hranjenjem celic upada. Tako kot pri *M. cynos*, so se tudi pri sevih *M. canis* eritrociti vezali na nativne kolonije celic v testu hemadsorpcije. Monoklonska protitelesa 3E3, ki specifično prepoznavajo hemaglutinin *M. canis*, inhibirajo hemaglutinacijo sevov Larissa in PG14 ter tudi njuno hemadsorpcijo v koncentraciji $\sim 1 \mu\text{g ml}^{-1}$.

4.3.2 Izločanje hemaglutinina v tekoče gojišče s proteini nizkih molekulskih mas in vezava na eritrocite

Tako kot za *M. cynos* smo tudi pri *M. canis* preverili, ali se hemaglutinin s celic odpušča v okoliški medij. Celice seva Larissa smo čez noč gojili v gojišču s proteini nizkih molekulskih mas. Supernatant smo inkubirali z eritrociti, da bi se hemaglutinin *M. canis* vezal na eritrocite. Vezava preko eritrocitov ni bila tako uspešna kot pri *M. cynos*, verjetno je bila tudi stopnja izločanja v gojišče manjša. HA titer supernatanta s proteini nizkih molekulskih mas je bil le od 1 : 10 do 1 : 20, titer supernatanta z izoliranim HacA pa le od 1 : 5 do 1 : 10. mAb 3E3 je v analizi western reagiral z dvema proteinoma, velikosti 220 kDa in manj kot 200 kDa.

4.3.3 Identifikacija proteina in gena za hemaglutinin HacA *M. canis*

Na poliakrilamidnem gelu smo ločili supernatant *M. canis* Larissa in del proteinov prenesli na membrano Immobilon-P. Gel smo pobarvali z barvilom Coomassie Brilliant Blue, proteine na membrani pa dokazali z uporabo monoklonskih protiteles 3E3 (slika 21).

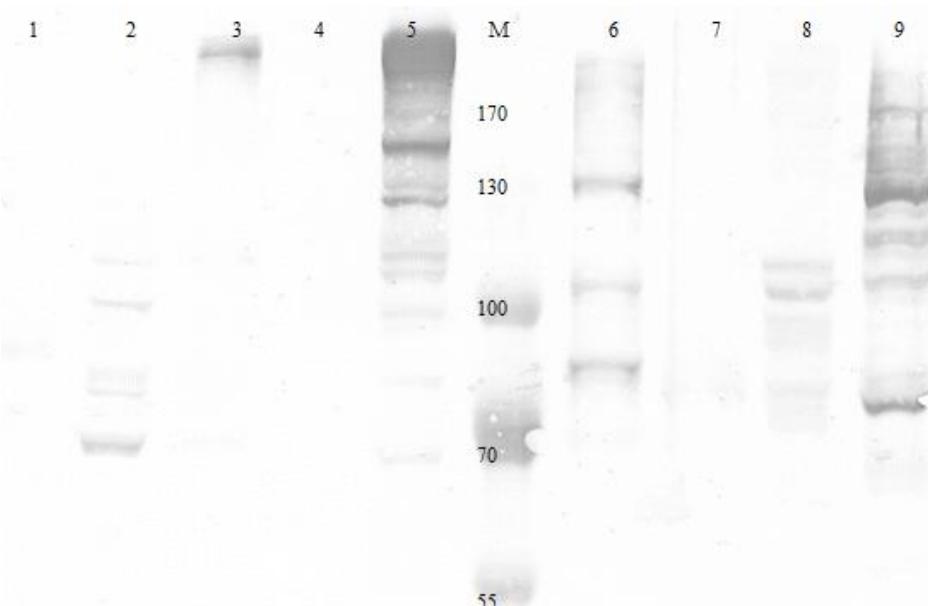


Slika 21: Domnevni hemaglutinin HacA *M. canis* Larissa. Na levi strani je prikazan gel pobarvan s Coomassie, z dvema puščicama sta označeni proteinski lisi, ki smo ju poslali na določanje zaporedja (zgornja in spodnja lisa). Na desni so proteini celičnega lisata, preneseni na membrano Immobilon-P in označeni z monoklonskim protitelesom 3E3.

Figure 21: Western blot analysis of putative haemagglutinin HacA of *M. canis* Larissa. On the left side are proteins of whole cell lysates stained with Coomassie. The arrows indicate two protein bands (upper and lower) that were sent for sequencing. On the right are proteins blotted onto Immobilon-P membrane and detected with 3E3 monoclonal antibody.

Domnevni hemaglutinin smo na določanje aminokislinske sekvence poslali dvakrat, v obeh primerih zgornjo in spodnjo proteinsko liso, za katero smo v vzporedni analizi na membrani Immobilon-P dokazali, da jo prepoznavajo monoklonska protitelesa 3E3, specifična za hemaglutinin *M. canis*.

Iz dobljenega zaporedja peptidov smo v genomih *M. canis* identificirali protein, domnevni hemaglutinin HacA (Priloga F). Pri prvem sekvenciranju so se podatki peptidov ujemali z deli aminokislinskega zaporedja pri 264 kDa proteinu *M. canis* UF G1 (WP_044283842.1), pri drugem pa s sorodnim (244 kDa) proteinom *M. canis* UF 31 (WP_044091246.1). Na podlagi teh rezultatov smo identificirali zaporedje ustreznih genov ter tudi sorodna aminokislinska zaporedja pri sevih UF G4 (WP_044286246.1) in UF 33 (WP_044094105).



55

Slika 22: HacA pri različnih sevih *M. canis*. Membrana Immobilon-P je bila inkubirana s protitelesi 3E3, ki prepoznavajo hemaglutinin *M. canis*. 1, *M. canis* B16/08; 2, LV; 3, UF G1; 4, UF G4; 5, Larissa; 6, PG14^T-1; 7, PG14^T-2; 8, UF 31; 9, UF 33. M, velikostni standard (Thermo Fisher Scientific).

Figure 22:HacA in different *M. canis* strains. Immobilon-P membrane was incubated with 3E3 antibodies, that recognize haemagglutinin of *M. canis*. 1, *M. canis* B16/08; 2, LV; 3, UF G1; 4, UF G4; 5, Larissa; 6, PG14^T-1; 7, PG14^T-2; 8, UF 31; 9, UF 33. M, prestained proteins of the molecular mass marker (Thermo Fisher Scientific).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Pasje mikoplazme so pogosti spremljevalci okužb pri psih, mehanizmi povzročanja bolezni in preživetja v gostitelju pa do danes niso dobro pojasnjeni. Predvsem izstopata bakteriji *Mycoplasma cynos*, ki povzroča kronične okužbe dihal in *Mycoplasma canis*, ki povzroča okužbe urogenitalnih poti in težave pri reprodukciji. Druge vrste mikoplazem, ki povzročajo resna obolenja živali in ljudi, se pri vzpostavljanju okužbe opirajo na številne mehanizme – izogibanje imunskemu sistemu preko posnemanja gostiteljevih antigenov, površinsko spremjanje molekul, ki pridejo v stik z imunskim sistemom gostitelja, preživetje znotraj fagocitirajočih in nefagocitirajočih celic ipd. (Chalker, 2005; Rottem, 2003). Pred pričetkom naše raziskave je bilo potrjeno, da pasje mikoplazme sintetizirajo encim nevraminidazo, drugi dejavniki patogenosti pa še niso pojasnjeni.

Za razumevanje mehanizmov nastanka okužb in njihovo preprečevanje nas zanima, kako se bakterije prebijejo do ključnih receptorskih mest na površini gostiteljskih celic in kako jim v daljšem časovnem obdobju uspe pretendati imunski sistem gostitelja. Tekom evolucije patogene bakterije razvijajo vedno nove načine za povečanje stopnje preživetja, pri čemer imajo ključno vlogo posamezne molekule, ki jim v boju za obstanek dajejo prednost pred drugimi organizmi.

Ena izmed takih molekul je nevraminidaza. Encim priprada razredu glikozil hidrolaz in sodeluje v katabolizmu sladkorjev. Nevraminidaze bakterij si delijo številne strukturne podobnosti, njihove biokemijske lastnosti pa se močno razlikujejo (Kim in sod., 2011). Pri prokariontih je nevraminidazna aktivnost zabeležena že pri več kot 70 mikroorganizmih (Roggentin in sod., 1993), tudi pri številnih vrstah mikoplazem, npr. *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. alligatoris*, *M. neurolyticum*, *M. meleagridis*, *M. corogypsi* (Berčič in sod., 2008b, 2012; Brown in sod., 2004; May in sod., 2007). Njena prisotnost pri številnih patogenih vrstah bakterij nakazuje, da nevraminidaza na nek način izboljšuje potencial za povzročanje okužbe ali obstanek v imunokompetentnem gostitelju (Traving in Schauer, 1998).

Berčič in sodelavci (2012) so v encimogramu pokazali, da imata tudi *M. canis* in *M. cynos* aktivno nevraminidazo. Glede na podatke o eksperimentalno določeni velikosti encimov iz te raziskave smo predpostavili, da je aminokislinsko zaporedje nevraminidaze *M. cynos* za

približno 200 aminokislin krajše od aminokislinskega zaporedja nevraminidaze *M. canis*. Na podlagi podatkov iz genomov *M. canis* PG14 in *M. cynos* C142, smo izbrali začetne oligonukleotide in uspešno pomnožili gen za nevraminidazo pri različnih sevih teh dveh bakterij, ki so izkazovali visoko nevraminidazno aktivnost (*M. canis* Larissa, slovenski klinični izolat ter *M. cynos* H831^T, 105, 896, 2296 in 2297). S pomočjo bioinformacijskih orodij smo pridobili podatke o aminokislinskih zaporedjih nevraminidaz (prilogi D in E). Potrdili smo zastavljeno hipotezo, saj ima nevraminidaza *M. cynos* 1137 aminokislin, nevraminidaza *M. cynos* pa 944 aminokislin, kar je 193 aminokislin manj.

Neizbežno se pri tem postavlja vprašanje, ali imajo razlike v dolžini aminokislinskega zaporedja fiziološki pomen? Razlike v številu aminokislin seveda vplivajo na biokemijske lastnosti molekul. Nevraminidaza *M. canis* Larissa ima npr. izoelektrično točko v kislem območju (5,96), *M. cynos* pa v bazičnem območju (okrog 9,20). Ker vrednost pI vpliva na topnost molekule v okolju z določenim pH in tudi določa njen neto naboj, bosta imeli molekuli v podobnem pH okolju različne biokemijske lastnosti. Dice in Goldberg (1975) sta npr. ugotovila, da imajo proteini z izoelektrično točko v kislem območju krajšo življenjsko dobo kot proteini z bazično ali nevtralno pI. V našem primeru bi to pomenilo, da imajo sevi *M. cynos* v povprečju veliko višjo nevraminidazno aktivnost kot sevi *M. canis*, ker je njihova nevraminidaza v stanju *in vivo* bolj stabilna oz. manj podvržena delovanju osnovnih kataboličnih procesov gostiteljevega metabolizma. Razlike v pI oz. neto naboju molekule tudi pomenijo, da imata nevraminidazi *M. canis* in *M. cynos* v pogojih nevtralnega pH nasproten naboj in privlačita drugače nabite molekule (tarčna mesta), kar lahko pojasni opažene razlike v nevraminidazni aktivnosti med vrstami. Seveda je v pogojih *in vivo* izoelektrična točka lahko drugačna kot tista, ki jo določimo teoretično na podlagi primarnega aminokislinskega zaporedja. Dolžina in struktura aminokislinskega zaporedja seveda vplivata tudi na sekundarno in terciarno strukturo proteina in v tej smeri bi morali nadalje iskati razloge za razlike v učinkovitosti delovanja. Že z uporabo bioinformacijskih orodij (TMHMM Server 2.0) smo pokazali, da se pri sicer krajšem zaporedju nevraminidaze *M. cynos* večji del aminokislin nahaja v citosolni oz. membranski regiji (do prvih 106 aminokislin) v primerjavi z *M. canis* (le prvih 29 aminokislin). Nevraminidazi *M. synoviae* in *M. gallisepticum*, ki imata tudi močno nevraminidazno aktivnost, imata 938 aminokislin, kar je v skladu s podatki o nevraminidazi *M. cynos*.

Ker smo eksperimentalno potrdili, da obstajajo razlike v nevraminidazni aktivnosti med sevi posameznih vrst pasjih mikoplazem, smo predpostavili, da se razlikujejo nukleotidna in aminokislinska zaporedja nevraminidaz med sevi. Na genetskem nivoju gre za točkovne

mutacije posameznih nukleotidov, ki vodijo v spremembe tripletov bralnega okvirja genetskega koda in razlike v aminokislinskih zaporedjih, kot je razvidno iz poravnav v prilogah D in E. Da bi pojasnili razlike v delovanju nevraminidaz med sevi smo preverili ali se spremembe nahajajo v regijah esencialnih za nevraminidazno aktivnost. Določili smo prisotnost enega RIP motiva, ki predstavlja aktivno mesto encima (Kim in sod., 2011). Tako pri *M. canis* kot pri *M. cynos* je motiv ohranjen in se med sevi ne razlikuje. Podobno velja za 3 motive Asp škatle pri *M. canis* in 4 motive pri *M. cynos*, ki naj bi sicer prispevali k stabilnosti sekundarne in terciarne proteinske strukture in ne sodelujejo pri vezavi liganda (Copley in sod., 2001). Zgolj na podlagi razlik v primarni aminokislinski strukturi ne moremo pojasniti razlike v delovanju nevraminidaz *M. canis* in *M. cynos*.

Z uporabo testa NEAC smo neposredno dokazali, da so nevraminidaze *M. canis*, *M. cynos* in *M. molare* aktivne v pogojih *in vitro* (preglednica 9). Pri *M. edwardii* nevraminidazna aktivnost ni bila prisotna. Nevraminidaza ima pri mikoplazmah in drugih bakterijah dve pomembni vlogi. Bakterije same navadno nimajo biokemijskih poti za sintezo sialičnih kislin, encim jim tako pomaga pridobivati sialično kislino iz okolja. Bakterije, ki imajo nevraminidazo, namreč pogosto živijo v tesnem stiku z višje razvitimi organizmi (kot paraziti ali komenzali). Nevraminidaza odceplja sialično kislino iz sialoglikoproteinov gostitelja in ta nadalje služi kot vir ogljika ali energije. Pri številnih patogenih bakterijah pa raziskovalci predpostavljajo, da predstavlja nevraminidaza tudi pomemben virulenčni dejavnik, ki olajša širjenje bakterije znotraj gostitelja (Corfield, 1992). *Clostridium perfringens*, ki pri ljudeh povzroča nekrozo mišičnega tkiva (gangrena), ima potentno nevraminidazo, ki igra ključno vlogo pri širjenju bolezni. Z odcepljanjem sialičnih kislin z glikoproteinov gostitelja, izpostavlja nova vezna mesta, na katera se veže in si tako olajša prehod skozi tkivo (Roggentin in sod., 1992). S stanji povišanega delovanja nevraminidaz patogenih bakterij je pogosto povezana tudi anemija, saj so eritrociti živalskih vrst prekriti s slojem sialičnih kislin. Te vplivajo na življenjski cikel eritrocitov in preprečujejo njihovo razgradnjo. Smrt eritrocitov je sicer povezana z delovanjem serumskih sialidaz, ki odstranijo sialične kisline, stik s spodaj ležečimi galaktoznimi ostanki pa je signal za fagocitozo (Glasgow in Hill, 1980; Thacker in Johnson, 1998; Traving in Schauer, 1998). Podoben vpliv nevraminidaz na glikoproteine gostitelja so opisali tudi pri drugih patogenih bakterijah, npr. *Salmonella typhimurium*, *Trypanosoma cruzi*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Porphyromonas gingivalis* (Li in sod., 2012).

Zanimalo nas je, ali sta tudi nevraminidazi *M. canis* in *M. cynos* sposobni odcepljati sialično kislino s površine glikoproteinov. Ta je lahko na sosednji slatkorni ostanek vezana preko $\alpha(2,3)$ ali $\alpha(2,6)$ galaktozne vezi. Predpostavili smo, da nevraminidazi desializirata glikoproteine (tudi glikoproteine gostitelja) in da obstajajo razlike v učinkovitosti odcepljanja sialične kisline, ki je vezana preko različnih tipov glikozidnih vezi. V testih z uporabo lektinov MAA (*Maackia amurensis*) in SNA (*Sambucus nigra*) (Yamamoto in sod., 1996) ter glikoproteinov fetuina in transferina smo ugotovili, da lahko nevraminidazi obeh vrst odcepita vezano sialično kislino. Molekula fetuina vsebuje oba tipa vezi (Baenziger in Fiete, 1979). Ugotovili smo, da *M. canis* in *M. cynos* v pogojih *in vitro* dobro cepita sialično kislino, ki je vezana preko $\alpha(2,3)$ vezi, desializacija $\alpha(2,6)$ vezi pa je veliko slabša. Za razlogo teh rezultatov se moramo obrniti na podatke o sializiranosti glikoproteinov v različnih bioloških okoljih. Vezava sialične kisline preko $\alpha(2,6)$ vezi je veliko bolj pogosta pri glikoproteinih, ki se nahajajo v serumu, medtem ko glikoprotein sluzi dihal in urogenitalnih poti vsebujejo sialično kislino vezano preko $\alpha(2,3)$ vezi. V luči teh dognanj so rezultati desializacije posledica prilagoditve na življenjsko okolje mikoplazme. Tako *M. canis* kot *M. cynos* naseljujeta sluznico (urogenitalnih poti oz. dihal) in pričakovano je, da se nevraminidaza kot virulenčni dejavnik preferenčno odziva na sialično kislino vezano preko $\alpha(2,3)$ vezi.

V testiranih pasjih serumih (preglednica 8), ki so bili odvzeti živalim z različnimi bolezenskimi znaki, med drugim je obstajal tudi sum na okužbe z mikoplazmami, so prisotna specifična protitelesa, ki prepoznavajo antigenske determinante na površini celic *M. canis*, *M. cynos* in v manjšem obsegu tudi *M. molare* (slika 12; neobjavljeni podatki). Serum psice Larissa, iz katere je bil tudi izoliran istoimenski sev *M. canis* (bris vagine), je v testu DIBA zelo močno reagiral s površinskimi determinantami celic *M. canis* Larissa, vendar pa tudi s celicami *M. cynos*. Iz same strukture testa ni možno pokazati, ali razlike izvirajo iz navskrižne reaktivnosti med molekulami, ki si delijo podobne antigenske determinante ali pa so bile živali okužene z več vrstami hkrati. Test DIBA nam je zato služil bolj kot preliminarni test za *in vitro* preverjanje imunogenega potenciala celic mikoplazem v vzorcih odvzetih *in vivo*.

Preveriti smo želeli tudi ali nevraminidazi *M. canis* in *M. cynos* različno učinkovita cepita sialično kislino, ki je vezana na glikoproteinih brisov mukoznih površin. Ti so bili odvzeti živalim ob znakih okužbe, in sicer smo imeli na razpolago brise grla, žrela, vulve in prepucija. Sialoglikoproteini mukusa imajo pomembne fizikalne, imunološke in baktericidne lastnosti, saj prekrivajo in ščitijo epitelne površine. Na različnih mukoznih

površinah so prisotni strukturno različni sialoglikoproteini, kar odraža tako razlike v fizioloških funkcijah posameznih organskih sistemov kot tudi nakazuje na sočasno evolucijo gostitelja s patogenimi mikroorganizmi (Lewis A. L. in Lewis W. G., 2012). Pričakovali smo, da bodo rezultati desializacije glikoproteinov iz brisov potrdili preliminarne rezultate desializacije s kontrolnimi glikoproteini (fetuin in transferin), t.j. preferenčno cepljenje sialične kisline vezane preko $\alpha(2,3)$ vezi. Vendar smo v preliminarnih testih preverili sializacijo glikoproteinov v vzorcih in ugotovili, da je stopnja sializacije prenizka oz. sploh nismo dobili pozitivnih rezultatov z vezavo lektinov MAA in SNA. Kontrolna glikoproteina fetuin in transferin sta v istem testu dala pozitivne reakcije. Testi desializacije tako niso bili izvedljivi, saj negativni rezultati desializacije ne bi odražali dejanskega stanja delovanja nevraminidaz pasjih mikoplazem (lažno negativni). Najverjetnejše je bil količina vzorca pri odvzemu brisov premajhna za uspešno izvedbo testov.

Izvencelične glikozidaze so torej potencialni kandidati, ki pomembno oblikujejo ekologijo določenih bakterij. Pri predstavnikih rodu *Mycoplasma* so prisotni aleli genov za sialidaze (*nan*) ter tudi za galaktozidazo (*lac*) in heksozaminidazo (*nag*). Potencialne funkcionalne razlike med ortologi teh genov bi pomagale pojasniti razlike v tkivnem tropizmu in virulenci sevov. Zanimanje za strukture sialidaz in njihove katalitske mehanizme ima pomen za razvoj sialidaznih inhibitorjev v farmacevtski industriji. Nevraminidazi *M. canis* in *M. cynos* predstavljata potencialni tarči za razvoj zdravil, ki bi omogočala vsaj lajšanje simptomov pogosto subkliničnih kroničnih okužb.

Hemaglutinini so površinski antigeni, ki omogočajo vezavo na receptorje s sialično kislino (Benčina, 2002). Ti so med drugim prisotni tudi na eritrocitih različnih živalskih vrst. Hemaglutinacijska sposobnost je visoko variabilna lastnost, ki variira med vrstami in celo sevi, ter se periodično zmanjšuje. Nanjo negativno vplivajo večkratni cikli odtajevanja in zamrzovanja celic ter denaturacijski agensi, npr. SDS in povisana temperatura.

V naši raziskavi smo prvi identificirali in opisali hemaglutinin *M. cynos* HapA (Kastelic in sod., 2015). Zapis za protein se nahaja v genu, ki pripada večgenski družini približno dvajsetih genov pri sevu *M. cynos* C142 (Walker in sod., 2013). V genomu *M. cynos* C142 ti geni predstavljajo približno 3 % kodirajočega zaporedja DNA, kar je presenetljivo veliko. Med redkimi vrstami mikoplazem, ki sintetizirajo protein hemaglutinin sta tudi *M. synoviae* in *M. gallisepticum*, ki sicer povzroča okužbe perutnine (Benčina, 2002). Kljub temu, da *M. cynos* sicer filogenetsko pripada gruči *M. synoviae*, pa so geni *hap* bolj

sorodni genski družini *vlhA* *M. gallisepticum*. Gre za lipoproteine, ki vsebujejo regije bogate s prolini (motiv PRR, angl. proline rich regions), njihovi geni pa so organizirani v gručah in translacijsko sposobni. Hemaglutinini ptičjih mikoplazem izkazujejo variabilno ekspresijo, saj prihaja do preklopa med antigenskimi variantami proteina (Markham in sod., 1998), kar smo za HapA dokazali tudi v naši študiji za klone seva *M. cynos* 2297.

Bradley in sodelavci (1988) so pokazali, da se hemaglutinin *M. gallisepticum* veže na glikoforin, poglaviti sializirani glikoprotein na površini eritrocitov. Pri *M. cynos* smo pri vseh preiskanih sevih dokazali visoke HA titre, kar nakazuje, da se HapA veže na receptorje, ki vsebujejo sialično kislino. Poleg eritrocitov so to tudi druge molekule gostitelja, npr. glikoproteini v serumu. O sposobnosti hemaglutininov *M. gallisepticum* in *M. synoviae*, da se vežejo na receptorje s sialično kislino je poročal že Razin (1985). Nevraminidaza, ki jo sintetizirajo tudi *M. canis*, *M. cynos* in *M. molare*, pa povzroča desializacijo glikoproteinov z vezano sialično kislino in posledično preprečuje vezavo celic mikoplazem na takšne receptorje, kot so poročali že Banai in sodelavci (1978) ter Berčič in sodelavci (2011, 2012).

Vsi preiskani sevi *M. cynos* so sintetizirali HapA velik okrog 65 kDa. Tudi za rHapA smo potrdili, da je velik okrog 65 kDa. Teoretična molekulska masa glede na aminokislinsko zaporedje je sicer nižja (44,6 kDa za sev H831^T). Možna razloga tega pojava je, da visok delež prolinov v aminokislinskem zaporedju (~20 %) povzroči počasnejšo migracijo proteina na poliakrilamidnem gelu. Podoben pojav so zabeležili tudi Benčina in sodelavci (2001) za N-terminalni del *M. synoviae* hemaglutinina, ki prav tako vsebuje regije bogate s prolinom. HapA je najverjetneje lipoprotein, čeprav nam tega ni uspelo dokazati neposredno. Pri sevih *M. cynos* 896, 2296 in 1334 smo z uporabo 1%-raztopine neionskega detergenta Triton X-114 dokazali, da je HapA prisoten v hidrofobni fazi, kar nakazuje na prisotnost lipidne komponente (neobjavljeni podatki). Medtem ko imajo (lipoproteini) hemaglutinini *M. synoviae* in *M. gallisepticum* na prvem ogljikovem ostanku (C₁) dve acilni skupini (Chambaud in sod., 1999), je HapA najverjetneje triaciliran. V postopku določanja proteinskega zaporedja smo namreč ugotovili, da je protein N-terminalno blokiran. O triaciliranih lipoproteinih pri človeških mikoplazmah *M. pneumoniae* in *M. genitalium* so poročali tudi Shimizu in sodelavci (2007, 2008).

V naši raziskavi smo za analize uporabili tudi brezcelične supernatatne, ki so pri *M. cynos* vsebovali približno 65 kDa velik protein, HapA. Vzorci teh supernatantov so imeli tudi močno nevraminidazno aktivnost. Tudi May in Brown (2009) sta že poročala o vsebnosti

nevraminidaze (sialidaze) v *M. cynos* brezceličnih supernatantih. Oba proteina sta očitno prisotna na površini celice in se s površine tudi odpuščata v okoliški medij. Glede na vlogo teh proteinov v borbi proti imunskemu sistemu gostitelja je njuna lokacija na površini membrane za mikoplazme ključnega pomena.

Prisotnost topne oblike HapA je omogočila njegovo izolacijo iz brezceličnega supernatanta preko vezave na kokošje in pasje eritrocite, medtem ko za HacA izolacija ni potekala na enak način. Bodisi je vezava HacA na membrani *M. canis* močnejša oz. se ta ne odpušča z membrane. Mogoče je tudi, da je HacA na površini celic prisoten le v majhni količini, kar bi tudi pojasnilo rezultate testov hemaglutinacije, kjer so sevi *M. canis* dosegali nižje titre v primerjavi z *M. cynos*. Mehanizem odpuščanja hemaglutinina HapA s površine celic *M. cynos* ostaja nepojasnjen. Odpuščanje proteinov v brezcelični medij sicer pri mikoplazmah ni osamljen pojav. Pod enakimi pogoji obdelave celične usedline in inkubacije preko noči v mediju, ki vsebuje le proteine nizkih molekulskih mas so Berčič in sodelavci (2011) ter Cizelj in sodelavci (2011) uspeli identificirati in izolirati hemaglutinin, nevraminidazo in cisteinsko proteazo *M. synoviae*. Tudi Glew in sodelavci (2000) so poročali, da je bila v tekočem mediju po dveh dnevih inkubacije kolonij *M. agalactiae* prisotna velika količina lipoproteina Vpma. Z nadaljnji raziskavami bi morali potrditi, ali se HapA tudi v pogojih *in vivo* odpušča s površine celic *M. cynos* in ali to na kakršenkoli način pripomore k povišani sposobnosti povzročanja bolezni pri psih.

Testirali smo ali je sposobnost hemaglutinacije določenega seva odvisna od vrste uporabljenih eritrocitov. Psi pogosto izkazujejo kronične znake okužbe z mikoplazmami, pri čemer se sproži imunski odziv, ki omogoča nastanek specifičnih protitles, usmerjenih proti imunogenim determinantam na površini mikoplazemskeih celic. Zato smo želeli določiti ali biološke tekočine okuženih živali (serum, izpirki žrela in reproduktivnih organov) vsebujejo protitelesa, ki lahko inhibirajo hemaglutinacijo. Ugotovili smo, da so v številnih tekočinah prisotna protitelesa, ki imajo sposobnost vezave na molekule hemaglutininov na površini mikoplazemskeih celic in tako omogočajo inhibicijo hemaglutinacije. Hemaglutinini so očitno ene izmed poglavitnih površinskih molekul, ki sprožijo imunski odziv gostitelja. Zanimivo, da so protitelesa v številnih serumih reagirala tako z *M. cynos* kot tudi z *M. canis*, kar nakazuje na evolucijsko ohranjenost antigenskih determinant pri teh dveh vrstah.

V določeni časovni točki je najverjetneje, da populacija *M. cynos* izraža le določene *hap* gene, mogoče tudi samo enega (*hapA*). Mehanizem ekspresije *hapA* gena ni pojasnjen,

prav tako ostaja nepojasnjeno, zakaj je v genomu mikoplazem prisotno tako veliko število kopij *hap* genov. Predvsem slednje se zdi zelo energetsko potratno v organizmu, ki je tekom evolucije vse svoje moči oprl na izjemno obsežno redukcijo genov v genomu. Pri številnih drugih vrstah mikoplazem so različni motivi v genskem zaporedju promotorja odgovorni za selektivno ekspresijo enega gena, predvsem v širšem okvirju multgenske družine (Glew in sod., 1998; Zimmerman, 2014). V genomu *M. cynos* C142 imajo različni *hap* geni zelo podobna nukleotidna zaporedja promotorja, večje razlike so prisotne le pri genu MCYN_RS01445, ki kodira homolog HapA proteina. Ni znano ali sev C142 izraža ta protein ali ne.

Zanimivo bi bilo dokazati, da so geni *hap* pomembni v biologiji *M. cynos* in da, tako kot velja za *hapA*, kodirajo lipoproteine, ki omogočajo vezavo bakterije na gostiteljske celice, posledično pa tudi okuževanje organov in kolonizacijo tkiv. Sevi *M. cynos* izkazujejo širok tkivni tropizem, saj so se sposobni naseliti v številnih organih pri psih, med drugim reproduktivne organe, pljuča, nos in grlo, najdemo jih tudi v semenski tekočini in krvi (Kastelic in sod., 2015). Podatki iz naše študije nakazujejo, da HapA povzroči sprožitev sistemskega imunskega odziva pri psih. Serumi nekaterih psov, ki smo jih testirali v naši študiji namreč vsebujejo protitelesa, ki inhibirajo hemaglutinacijo *M. cynos*. Ti testi bi bili mogoče lahko uporabni v klinični diagnostiki kot hitri preliminarni pokazatelj okužbe oz. serološki test. Vendar obstaja možnost, da bi ekspresija različnih variant HapA vplivala na hemaglutinacijske titre, kot so že poročali za teste inhibicije hemaglutinacije pri *M. gallisepticum* in *M. synoviae* (Vardaman in Drott, 1980; Kleven in sod., 1988).

Prisotnost specifičnih protiteles posredno dokazuje, da *M. cynos* tudi v pogojih *in vivo* sintetizira protein HapA. Ali lahko tak protitelesni odziv pri živali omeji ali celo odstrani okužbo s to patogeno bakterijo še ni znano. Sposobnost *M. cynos*, da proizvaja antigenske variante proteina HapA, bakteriji omogoča prilagoditev na mehanizme imunskega odziva gostitelja in omogoča izmikanje delovanju molekul imunskega sistema, ki bi sicer povzročitelja odstranile. To najverjetneje povzroča kronične subklinične okužbe.

V tej študiji smo pokazali, da antigenske variante nastajajo na dva načina. Namesto enega *hap* gena se prične izražati drug gen, kar vodi v spremembe antigenskih determinant proteinskih produktov. Pri klonih seva 2297 pa smo ugotovili, da pogosto prihaja tudi do sprememb znotraj nukleotidnega (in aminokislinskega) zaporedja izraženih *hap* genov ter njihovih produktov. Prihaja do aminokislinskih zamenjav, ki povzročajo spremembe v antigenih na površini celic. Raznolikost znotraj zaporedij *hap* genov omogoča nastanek

različnih Hap proteinov. Zaenkrat še nimamo eksperimentalnih podatkov, ki bi potrdile takšne rekombinacije in variacije v proteinskem zaporedju, je pa to pogost pojav tudi pri drugih patogenih vrstah mikoplazem (Zimmerman, 2014).

M. cynos povzroča pri svojem gostitelju bolj izrazite zdravstvene težave kot *M. canis*. Delno verjetno tudi zato, ker so pljučna tkiva bolj izpostavljena delovanju zunanjega okolja in na udaru različnih mikroorganizmov. Tudi za kronične okužbe dihal pri psih je že potrjeno, da so posledica skupnega delovanja različnih bakterij in virusov (Chvala in sod., 2007). Večje zdravstvene težave gre tako mogoče bolj kot povišani patogenosti *M. cynos* pripisati hkratnemu delovanju številnih agensov. Hkrati so težave z okužbami rodil z *M. canis*, ki vodijo v neplodnost, problematične šele v rodni dobi živali, sama bakterija pa je lahko v obliki subklinične okužbe prisotna že dalj časa.

Temelj nadaljnjih raziskav povezave znanstvenih rezultatov z zdravljenjem in klinično sliko bi lahko predstavljale ravno imunogene molekule opisane v tej študiji. Na prvi pogled nepovezani molekuli, ki izkazujeta ravno nasprotno delovanje, predstavljata osnovo za uspešno povzročanje okužbe. Nevraminidaze z odcepljanjem sialične kisline z glikoproteinov mukoznih izločkov in površine celic naredijo pot za prodor bakterije. Hkrati odcepitev sialičnih kislin izpostavi nova vezna mesta oz. receptorje za vezavo bakterije preko hemaglutininov. Pri interpretaciji rezultatov je potrebno kritično oceniti pogoje pri raziskavah v pogojih *in vitro* in znanje ustrezeno prenesti na modele *in vivo*.

5.2 SKLEPI

- Aminokislinsko zaporedje nevraminidaze *M. cynos* je za ~200 aminokislin krajše od zaporedja nevraminidaze *M. canis*.
- Aminokislinska zaporedja nevraminidaz se med vrstami in med sevi iste vrste pasjih mikoplazem razlikujejo v zamenjavah posameznih aminokislin.
- Nevraminidaze *M. canis*, *M. cynos* in *M. molare* so encimsko aktivne, saj v ustreznih testih izkazujejo nevraminidazno aktivnost in lahko odcepijo sialično kislino z glikoproteinov.
- Pri desializaciji glikoproteinov prihaja do razlik v učinkovitosti odcepljanja sialične kisline vezane preko $\alpha(2,3)$ in $\alpha(2,6)$ glikozidne vezi. Nevraminidazi *M.*

canis in *M. cynos* bolj učinkovito cepita sialično kislino vezano preko $\alpha(2,3)$ glikozidne vezi.

- Hemaglutinini *M. canis* in *M. cynos* so imunogeni (lipo)proteini, ki se nahajajo na membrani celic in omogočajo vezavo eritrocitov na celično površino mikoplazem.
- V stanju okužbe gostitelji proti hemaglutininom sprožijo imunski odziv, saj so v serumih okuženih živali prisotna protitelesa, ki se vežejo na hemaglutinine in tudi preprečijo vezavo celic mikoplazem na eritrocite v pogojih *in vitro*.
- Hemaglutinini sorodnih vrst mikoplazem se vežejo na receptorje, ki vsebujejo sialično kislino (npr. receptorji na eritrocitih) v pogojih *in vitro*.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Vrste znotraj rodu *Mycoplasma* izkazujejo podobno fiziologijo in morfologijo. Njihovi glavni značilnosti sta obsežna redukcija genoma in odsotnost celične stene. Etiološko so sposobne povzročati obolenja pri različnih živalskih vrstah (prašiči, govedo, psi, mačke, perutnina) in tudi pri človeku. Med pasjimi mikoplazmami *M. canis* povzroča okužbe urogenitalnih poti in neplodnost, *M. cynos* pa povzroča resne okužbe dihal, kot je npr. pljučnica, povezana pa je bila tudi s povzročanjem pasje respiratorne okužbe (angl. CIRD, canine infectious respiratory disease). Faktorji, ki omogočajo uspešno kolonizacijo gostiteljskega tkiva, ostajajo nepojasnjeni. Kot to velja za druge patogene vrste mikoplazem, so možni patogeni dejavniki domnevni hemaglutinini in nevraminidaze. Ti dejavniki olajšajo kolonizacijo in preživetje v imunokompetentnem gostitelju.

Nevraminidaza (sialidaza) je encim, ki hidrolizira glikozidno vez med sialično kislino (ta predstavlja terminalni ostanek) in sosednjim sladkorjem pri številnih molekulah, npr. glikoproteinih. Nevraminidaze so že bile potrjene kot dejavnik virulence pri *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. neurolyticum* in *M. alligatoris*. *M. cynos* ima nevraminidazo veliko okrog 105 kDa, *M. canis* pa okrog 130 kDa, torej je slednja približno 200 aminokislin večja. Kljub temu, da se strukturno razlikujeta, pa obe posedujeta sposobnost desializacije glikoproteinov v pogojih *in vitro*. Obstaja specifika cepljenja sialične kisline, ki je vezana preko $\alpha(2,3)$. To *M. canis* in *M. cynos* odcepljata veliko učinkoviteje kot sialično kislino vezano preko $\alpha(2,6)$ vezi.

Hemaglutinini *M. canis* in *M. cynos* so visoko imunogeni proteini, ki povzročajo hemadsorpcijo kokošjih in pasjih eritrocitov na kolonije mikoplazem in hemaglutinacijo s celicami. Pri okuženih psih vzbudijo močan imunski odziv s tvorbo specifičnih protiteles. Pri *M. cynos* smo identificirali hemaglutinin HapA, ki je 65 kDa velik protein, sposoben hemadsorbcije in hemaglutinacije. Spontano se lahko cepi na manjše fragmente. Za fragment velikosti približno 25 kDa smo določili aminokislinsko zaporedje 23 aminokislin NNEMTPKVTVEAKSMELLLSVEK. Na tak način smo določili, da je protein pri sevu 896 homolog proteina WP_015287169.1 v genomu *M. cynos* C142. V genomu smo tudi identificirali družino sorodnih genov, ki so verjetno homologi hemaglutinina HapA. Pri *M. canis* smo hemaglutinin identificirali kot veliko večji protein (preko 200 kDa). Opazili smo, da samo določeni sevi *M. canis* izkazujejo sposobnost hemaglutinacije eritrocitov.

Številni mikoplazemski hemaglutinini se lahko vežejo na receptorje, ki vsebujejo sialično kislino, med drugim tudi na sializirani glikoforin, poglavitni receptor na površini eritrocitov. Nekatere molekule hemaglutinina se lahko s površine celic odpuščajo v okoliški medij. Brezcelični supernatant takega medija, ki vsebuje hemaglutinine odpuščene s celic, lahko povzroči tudi hemaglutinacijo eritrocitov različnih živalskih vrst. Serumi okuženih psov vsebujejo protitelesa, ki preprečijo hemaglutinacijo eritrocitov v testu inhibicije hemaglutinacije. Iz zbranih podatkov smo zaključili, da so hemaglutinini pasjih mikoplazem poglavitni (imunogeni) antigeni za okužene pse.

Potrdili smo, da imata patogeni pasji mikoplazmi *M. canis* in *M. cynos* določene aktivne molekule, ki jima omogočajo, da dalj časa preživita v imunokompetentnem gostitelju. Hemaglutinini in nevraminidaze imajo pomembno vlogo pri interakcijah s celicami in tkivom gostitelja, tudi preko sializiranih molekul, ki služijo kot receptorji. Veliko mehanizmov, ki omogoča borbo proti ali izogibanje imunskemu sistemu gostitelja, še ostaja nepojasnjениh in bodo predmet nadaljnih raziskav.

6.2 SUMMARY

Species from the genus *Mycoplasma* share a similar morphology and physiology as they have reduced genomic information and no cell wall. Ethiologically they are capable of causing infections in different animals (pigs, cows, dog, cat, poultry) and also in humans. Amongst canine mycoplasma, *M. canis* can cause disorders of the reproductive tract and infertility and *M. cynos* can cause serious respiratory tract infections such as pneumonia and has also been associated with canine infectious respiratory disease (CIRD). Factors that enable colonization of host tissue remain unknown. As is the case with other *Mycoplasma* species, putative haemagglutinins and neuraminidases could potentially be important pathogenic factors that enable colonization and survival in immunocompetent hosts.

Neuraminidase (sialidase) is an enzyme that hydrolyzes glycosidic bond between sialic acid (as a terminal residue) and the neighbouring sugar in several types of molecules, such as glycoproteins. They are confirmed virulence factors of *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. neurolyticum* and *M. alligatoris*. *M. cynos* has a neuraminidase of 105 kDa and *M. canis* that of 130 kDa, that is about 200 aminoacids bigger. Although structurally different, they have a similar capacity to desialylate glycoproteins *in vitro*. There seems to be a

different preference for cleavage of sialic acid bound via $\alpha(2,3)$ galactose bond over $\alpha(2,6)$ bond in both species.

Haemagglutinins of *M. canis* and *M. cynos* are highly immunogenic proteins that cause haemadsorption of chicken and dog erythrocytes to mycoplasma colonies and haemagglutination with cells. They elicit strong immune response in dogs, also forming specific antibodies. In *M. cynos* we have identified haemagglutinin HapA as a 65 kDa protein that is capable of haemagglutination and haemadsorption. It can spontaneously cleave into smaller fragments. For a protein fragment of approximately 25 kDa we have determined (Edman degradation) the aminoacid sequence of 23 aminoacids NNEMTPKVTVEAKSMELLSVEK. This identified the protein of strain 896 as a homologue of the protein WP_015287169.1 in the genome of *M. cynos* C142. In the genome of *M. cynos* there is a family of related genes, thought to be haemagglutinin homologues. In *M. canis* we have identified a much larger protein (over 200 kDa) to be the haemagglutinin, although further analyses are necessary to confirm that. Also in *M. canis* only certain strains show to be capable of haemagglutination. Several mycoplasma haemagglutinins can bind to receptors containing sialic acid (among others also glycophorin on chicken erythrocytes). We have also shown that part of haemagglutinin molecules can be released from the membrane and into growth medium. The cell-free supernatant of such medium can also haemagglutinate erythrocytes of different animal species. Sera of infected dogs contain antibodies which prevented haemagglutination of erythrocytes in haemagglutination inhibition tests. From all this data we conclude, that haemagglutinin of canine mycoplasmas is a major immunogenic protein for dogs.

We have confirmed that pathogenic canine mycoplasmas *M. canis* and *M. cynos* possess certain active molecules, that enable mycoplasma to survive for longer periods of time in immunocompetent hosts. Haemagglutinins and neuraminidases seem to have important roles in interactions with host tissue and cells, also via their sialylated molecules. A lot of the mechanism underlying the capacity to defend against host immune system remain to be investigated.

7 VIRI

- Abdelmoumen Mardassi B. B., Béjaoui Khiari A., Oussaief L., Landoulsi A., Brik C., Mlik B., Amouna F. 2007. Molecular cloning of a *Mycoplasma meleagridis*-specific antigenic domain endowed with a serodiagnostic potential. Veterinary Microbiology, 119: 31-41
- Baenziger J. U., Fiete D. 1979. Structure of the complex oligosaccharides of fetuin. The Journal of Biological Chemistry, 254, 3: 789-795
- Banai M., Kahane I., Razin S., Bredt W. 1978. Adherence of *Mycoplasma gallisepticum* to human erythrocytes. Infection and Immunity, 21, 2: 365-372
- Baum L. G., Paulson J. C. 1990. Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity. Acta Histochemica, 40: 35-38
- Benčina D. 2002. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. Avian Pathology, 31: 535-547
- Benčina D., Bradbury J. M. 1991. Indirect immunoperoxidase assay for the detection of antibody in chicken *Mycoplasma* infections. Avian Pathology, 20: 113-124
- Benčina D., Drobnič-Valič M., Horvat S., Narat M., Kleven S. H., Dovč P. 2001. Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. FEMS Microbiology Letters, 203, 1: 115-123
- Benčina M., Cizelj I., Berčič R. L., Narat M., Benčina D., Dovč P. 2014. Shared epitopes of avian immunoglobulin light chains. Veterinary Immunology and Immunopathology, 158, 3-4: 175-181
- Benson D. A., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Sayres E. W. 2015. GenBank. Nucleic Acids Research, 43: 30-35
- Berčič R. L. 2009. Sinteza in učinkovitost nevraminidaz pri bakterijah *Mycoplasma gallisepticum* in *Mycoplasma synoviae*. Doktorsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 113 str.

- Berčič R. L., Cizelj I., Benčina M., Narat M., Bradnury J. M., Dovč P., Benčina D. 2012. Demonstration of neuraminidase activity in *Mycoplasma neurolyticum* and of neuraminidase proteins in three canine *Mycoplasma* species. Veterinary Microbiology, 155, 2-4: 425-429
- Berčič R. L., Cizelj I., Dušanić D., Narat M., Zorman-Rojs O., Dovč P., Benčina D. 2011. Neuraminidase of *Mycoplasma synoviae* desialylates heavy chain of the chicken immunoglobulin G and glycoproteins of chicken tracheal mucus. Avian Pathology, 40, 3: 299-308
- Berčič R. L., Slavec B., Lavrič M., Narat M., Bidovec A., Dovč P., Benčina D. 2008a. Identification of major immunogenic proteins of *Mycoplasma synoviae* isolates. Veterinary Microbiology, 127: 147-154
- Berčič R. L., Slavec B., Lavrič M., Narat M., Zorman-Rojs O., Dovč P., Benčina D. 2008b. A survey of avian *Mycoplasma* species for neuraminidase enzymatic activity. Veterinary Microbiology, 130: 391-397
- Bethesda Research Laboratories. 1986. BRL pUC host: *E.coli* DH5 α competent cells. Focus, 8, 2: 9
- Blanchard A., Bébéar C. M. 2002. Mycoplasmas of humans. V: Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. Razin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 45-71
- Bolha L. 2010. Preverjanje nukleazne aktivnosti pri patogenih bakterijah izbranih vrst rodu *Mycoplasma*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 63 str.
- Bradley L. D., Snyder D. B., Van Deusen R. A. 1988. Identification of species-specific and interspecies-specific polypeptides of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. American Journal of Veterinary Research, 49, 4: 511-515
- Brown D. R., May M., Michaels D. L., Barbet A. F. 2012. Genome annotation of five *Mycoplasma canis* strains. Journal of Bacteriology, 194, 15: 4138-4139

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

Chalker V. J. 2005. Canine mycoplasmas. *Research in Veterinary Science*, 79, 1: 1-8

Chalker V. J., Barker E., Brownlie J. 2002. The use of PCR and culture for the detection of canine respiratory mycoplasmas. V: IOM congress 2002. Abstract book of the 14th international congress of the international organization for mycoplasmology (IOM), Dunaj, 7. – 12. julij 2002. Dunaj, University of Vienna general hospital: 134-136

Chalker V. J., Owen W. M. A., Paterson C., Barker E., Brooks H., Rycroft A. N., Brownlie J. 2004. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. *Microbiology*, 150: 3491-3497

Chambaud I., Wroblewski H., Blanchard A. 1999. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. *Trends in Microbiology*, 7, 12: 493-499

Chvala S., Benetka V., Möstl K., Zeugswetter F., Spergser J., Weissenböck H. 2007. Simultaneous canine distemper virus, canine adenovirus type 2 and *Mycoplasma cynos* infection in a dog with pneumonia. *Veterinary Pathology*, 44: 508-512

Citti C., Nouvel L. X., Baranowski E. 2010. Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future Microbiology*, 5, 7: 1073-1085

Cizelj I., Berčič R. L., Dušanić D., Narat M., Kos J., Dovč P., Benčina D. 2011. *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* express a cysteine protease CysP, which can cleave chicken IgG into Fab and Fc. *Microbiology*, 157, 2: 362-372

Copley R. R., Russell R. B., Ponting C. P. 2001. Sialidase-like Asp-boxes: sequence-similar structures within different protein folds. *Proteine Science*, 10, 2: 285-292

Corfield T. 1992. Bacterial sialidases – roles in pathogenicity and nutrition. *Gycobiology*, 2, 6: 509-521

Dice J. F., Goldberg A. L. 1975. Relationship between *in vivo* degradative rates and isoelectric points of protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 72, 10: 3893-3897

Dušanić D. 2012. Odziv celic sklepnega hrustanca na okužbo kokoši z bakterijo *Mycoplasma synoviae*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 169 str.

Dušanić D., Benčina D., Oven I., Cizelj I., Bencina M., Narat M. 2012. *Mycoplasma synoviae* induces upregulation of apoptotic genes, secretion of nitric oxide and appearance of an apoptotic phenotype in infected chicken chondrocytes. Veterinary Research, 43, 7: 1-14

Dušanić D., Berčič R. L., Cizelj I., Salmič S., Narat M., Benčina D. 2009. *Mycoplasma synoviae* invades non-phagocytic chicken cells *in vitro*. Veterinary Microbiology, 138: 114-119

Edward D. G., Fitzgerald W. A. 1951. The isolation of organisms of the pleuropneumonia group from dogs. Journal of General Microbiology, 5, 3: 566-575

Embree J. E., Embil J. A. 1980. Mycoplasmas in diseases of human. Canadian Medical Association Journal, 123, 2: 105-111

Frey J. 2002. *Mycoplasmas* of animals. V: Molecular Biology and Pathogenicity of *Mycoplasmas*. Razin S., Herrman R. (eds.). New York, KluwerAcademic/Plenum Publishers: 73-90

Gabridge M. G. 1984. *In vitro* models for host-parasite interactions involving mycoplasmas. Israel Journal of Medical Sciences, 20, 10: 920-923

Garnier J., Gibrat J. F., Robson B. 1996. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. Methods in Enzymology, 266: 540-53

Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R. D., Bairoch A. 2003. ExPASy, the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acid Research, 31, 13: 3784-3788

Genome. Bethesda, Maryland, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/> (29.05.2016)

Glasgow L. R., Hill R. L. 1980. Interaction of *Mycoplasma gallisepticum* with sialyl glycoproteins. Infection and Immunity, 30, 2: 353-361

Glew M. D., Baseggio N., Markham P. F., Browning G. F., Walker L. D. 1998. Expression of the pMGA genes is controlled by variation in the GAA trinucleotide repeat lengths within the 5'noncoding regions. Infection and Immunity, 66: 5833-5841

Glew M. D., Papazisi L., Poumarat F., Bergonier D., Rosengarten R., Citti C. 2000. Characterization of a multigene family undergoing high-frequency DNA rearrangements and coding for abundant variable surface proteins in *Mycoplasma agalactiae*. Infection and Immunity, 66: 5833-5841

Goding J. 1996. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. 3rd ed. London, Academic Press: 492 str.

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

Howard G. C., Kaser M. R. 2007. Making and using antibodies: a practical handbook. Boca Raton, Taylor & Francis Group: 394 str.

Hunt M. E., Brown D. R. 2007. Role of sialidase in *Mycoplasma alligatoris*-induced pulmonary fibroblast apoptosis. Veterinary Microbiology, 121: 73-82

Inamine J. M., Ho K. C., Loechel S., Hu P. C. 1990. Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma gallisepticum*. Journal of Bacteriology, 172, 1: 504-506

Ito T., Suzuki Y., Takada A., Kawamoto A., Otsuki K., Masuda H., Yamada M., Suzuki T., Kida H., Kawaoka Y. 1997. Differences in sialic acid-galactose linkages in the

chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection. *Journal of Virology*, 71, 4: 3357-3362

Johansson K. E., Heldtander M. U. K., Petterson B. 1998. Characterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primers. V: Methods in molecular biology. Vol. 104. Mycoplasma protocols. Miles R.J., Nicholas R.A.J. (eds.). Totowa, Humana Press Inc.: 145-165

Kastelic S., Cizelj I., Narat M., Tozon N., Chalker V. J., Lysnyansky I., Spergser J., Benčina D. 2015. Molecular characterization of the *Mycoplasma cynos* haemagglutinin HapA. *Veterinary Microbiology*, 175: 35-43

Kim S., Oh D.-B., Kang H. A., Kwon O. 2011. Features and applications of bacterial sialidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91: 1-15

King S. J., Hippe K. R., Weiser J. N. 2006. Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 59, 3: 961-974

Kleven S. H. 2003. Mycoplasmosis. V: Diseases of Poultry. Saif Y.M. (ed.). Ames, Iowa, Blackwell Pub.: 719-762

Kleven S. H., Morrow C. J., Whithear K. G. 1988. Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by haemagglutination-inhibition and restriction endonuclease activity. *Avian Diseases*, 33: 731-741

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685

Lavrič M., Benčina D., Kothlow S., Kaspers B., Narat M. 2007. *Mycoplasma synoviae* lipoprotein MSPB, the N-terminal part of VlhA haemagglutinin, induces secretion of nitric oxide, IL-6 and IL-1 β in chicken macrophages. *Veterinary Microbiology*, 121: 278-287

Lewis A. L., Lewis W. G. 2012. Host sialoglycans and bacterial sialidases: a mucosal perspective. *Cellular Microbiology*, 14, 8: 1174-1182

- Li C., Kurniyati K., Hu B., Bian J., Sun J., Zhang W., Liu J., Pan Y., Li C. 2012. Abrogation of neuraminidase reduces biofilm formation, capsule biosynthesis and virulence of *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*, 80, 1: 3-13
- Lo S. H. 2002. Apoptotic, antiapoptotic, clastogenic and oncogenic effects. V: Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. Razin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 403-416
- Ludwig W., Euzéby J., Whitman W. B. 2011. Road map of the phyla *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* and *Planctomycetes*. V: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4. Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (eds.). 2nd ed. New York, Springer: 1-19
- Manchee R. J., Taylor-Robinson D. 1969. Utilization of neuraminic acid receptors by mycoplasmas. *Journal of Bacteriology*, 98, 3: 914-919
- Maniloff J., Morowitz H. J. 1972. Cell biology of mycoplasmas. *Bacteriological Rewievs*, 36, 3: 263-290
- Markham P. F., Glew M. D., Browning G. F., Whithear K. G., Walker I. D. 1998. Expression of two members of the pMGA multigene family of *Mycoplasma gallisepticum* oscilates and is influenced by the pMGA-specific antobodies. *Infection and Immunity*, 66: 2845-2853
- May M., Brown D. R. 2009. Secreted sialidase activity of canine mycoplasmas. *Veterinary Microbiology*, 137: 380-383
- May M., Kleven S. H., Brown D. R. 2007. Sialidase activity in *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 51, 4: 829-833
- Narat M., Benčina D., Kleven S. H., Habe F. 1998. The hemagglutination-positive phenotype of *Mycoplasma synoviae* induces experimental infectious synovitis in chickens more frequently than does the hemagglutination-negative phenotype. *Infection and Immunity*, 66, 12: 6004-6009

- Noormohammadi A. H., Markham P. F., Kanci A., Whithear K. G., Browning G. F. 2000. A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. *Molecular Microbiology*, 35, 4: 911-923
- Ponnuraj K., Jedrzejas M. J. 2000. Mechanisms of hyaluronan binding and degradation: structure of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase in complex with hyaluronic acid disaccharide at 1.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 299, 4: 885-895
- Razin S., Yogev D., Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 4: 1049-1156
- Rhoades K. R. 1985. Selection and comparison of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinating and nonhemagglutinating variants. *Avian Disease*, 29, 4: 1170-1176
- Roggentin P., Rothe B., Kaper J. B., Galen J., Lawrisuk L., Vimr E. R., Schauer R. 1989. Conserved sequences in bacterial and viral sialidases. *Glycoconjugate Journal*, 6, 3: 349-353
- Roggentin T., Kleineidam R. G., Schauer R., Roggentin P. 1992. Effects of site-specific mutations on the enzymatic properties of a sialidase from *Clostridium perfringens*. *Glycoconjugate Journal*, 9, 5: 235-240
- Roggentin P., Schauer R., Hoyer L. L., Vimr E. R. 1993. The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer. *Molecular Microbiology*, 9, 5: 915-921
- Rosendal S. 1973. *Mycoplasma cynos*, a new canine Mycoplasma species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23, 1: 49-54
- Rosendal S. 1974. *Mycoplasma molare*, a new canine Mycoplasma species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 24, 1: 125-130
- Rosendal S. 1982. Canine mycoplasmas: their ecologic niche and role in disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 180: 1212-1214

Rottem S. 2002. Invasion of mycoplasmas into and fusion with host cells. V: Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. Razin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 391-401

Rottem S. 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiological Reviews*, 83, 2: 417-432

Rycroft A. N., Tsounakou E., Chalker V. J. 2007. Serological evidence of *Mycoplasma cynos* infection in canine infectious respiratory disease. *Veterinary Microbiology*, 120: 358-362

Sayed I. A., Hatten B. A. 1976. Isoelectric focusing of *Mycoplasma* proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 32, 4: 609-609

Schauer R., Shukla A. K., Schröder C., Müller E. 1984. The anti-recognition function of sialic acids: Studies with erythrocytes and macrophages. *Pure and Applied Chemistry*, 56, 7: 907-921

Severi E., Hood D. W., Thomas G. H. 2007. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology*, 153: 2817-2822

Shimizu T., Kida Y., Kuwano K. 2007. Triacylated lipoproteins from *Mycoplasma pneumoniae* activate nuclear factor-kappaB through toll-like receptors 1and 2. *Immunology*, 121, 4: 473-483

Shimizu T., Kida Y., Kuwano K. 2008. A triacylated lipoprotein from *Mycoplasma genitalium* activates NF-κB through Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2. *Infection and Immunity*, 76, 8: 3672-3678

Sievers F., Higgins D. G. 2014. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. V: Multiple sequence alignment methods. Vol. 1079. Russell D.J. (ed.). New York, Humana Press: 105-116

Sirand-Pugnet P., Citti C., Barré A., Blanchard A. 2007. Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Research in Microbiology*, 158: 754-766

Slavec B., Berčič R. L., Cizelj I., Narat M., Zorman-Rojs O., Dovč P., Benčina D. 2011. Variation of *vlhA* gene in *Mycoplasma synoviae* clones isolated from chickens. Avian Pathology, 40, 5: 481-489

Sonnhammer E. L., von Heijne G., Krogh A. 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. Proceedings of the 8th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, 6: 175-82

Taxonomy Browser. Bethesda, Maryland, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi> (16.04.2016)

Taylor, R. G., Walker, D. C., McInnes, R. R. 1993. *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. Nucleic Acids Research, 21: 1677-1678

Thacker T. C., Johnson F. B. 1998. Binding of bovine parvovirus to erythrocyte membrane sialoglycoproteins. Journal of General Virology, 79: 2163-2169.

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

Tully J. G. 1983. General cultivation techniques for mycoplasmas and spiroplasmas. V: Methods in Mycoplasmology. Volume I. *Mycoplasma* characterization. Razin S., Tully J. G. (eds.). London, Academic Press Inc.: 99-103

Tully J. G., Barile M. F., Del Giudice R. A., Carski T. R., Armstrong D., Razin S. 1970. Proposal for classifying strain PG-24 and related canine mycoplasmas as *Mycoplasma edwardii* sp.n. Journal of Bacteriology, 101, 2: 346-349

Vardaman T. H., Drott J. H. 1980. Comparison of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinating antigens by hemagglutination-inhibition test. Avian Diseases, 24: 637-640

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

Waites K.B., Talkington D.F. 2004. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clinical Microbiology Reviews, 17, 4: 697-728

Walker C. A., Mannerling S. A., Shields S., Blake D. P., Brownlie J. 2013. Complete genome sequence of *Mycoplasma cynos* strain C142. Genome Announcements, 1, 1: 196-212

Yamamoto K., Konami Y., Irimura T. 1996. Sialic acid-binding motif of *Maackia amurensis* lectins. Journal of Biochemistry, 121: 756-761

Yogev D., Browning G. F., Wise K. S. 2002. Genetic mechanisms of surface variation. V: Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. Razin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 417-443

Zeugswetter F., Weissenböck H., Shibly S., Hassan J., Spergser J. 2007. Lethal bronchopneumonia caused by *Mycoplasma cynos* in a litter of golden retriever puppies. The Veterinary Record, 161: 626-628

Zimmerman C. U. 2014. Current insights into phase and antigenic variation in mycoplasmas. V: Mollicutes. Molecular Biology and Pathogenesis. Browning G. F., Citti C. (eds.). Norfolk, Caister Academic Press: 165-196

ZAHVALA

»Prava modrost pride, ko spoznamo, kako malo razumemo o življenju, o sebi in o svetu okoli nas.«

Sokrat

Iskrena zahvala gre v prvi vrsti mentorju znan. svet.dr. Dušanu Benčini, brez katerega ne bi imela priložnosti podati se na to pustolovščino. Vaše znanje je neusahljiv vir navdiha!

Hvala prof. dr. Mojci Narat za strokovno in predvsem medčloveško pomoč. Hvala, ker smo za vas več kot samo zaposleni.

Članicam komisije najlepša hvala za konstruktivno kritiko, vse popravke in nasvete, ki so pomagali izboljšati to delo. Hvala za hiter pregled disertacije in zelo korekten odnos.

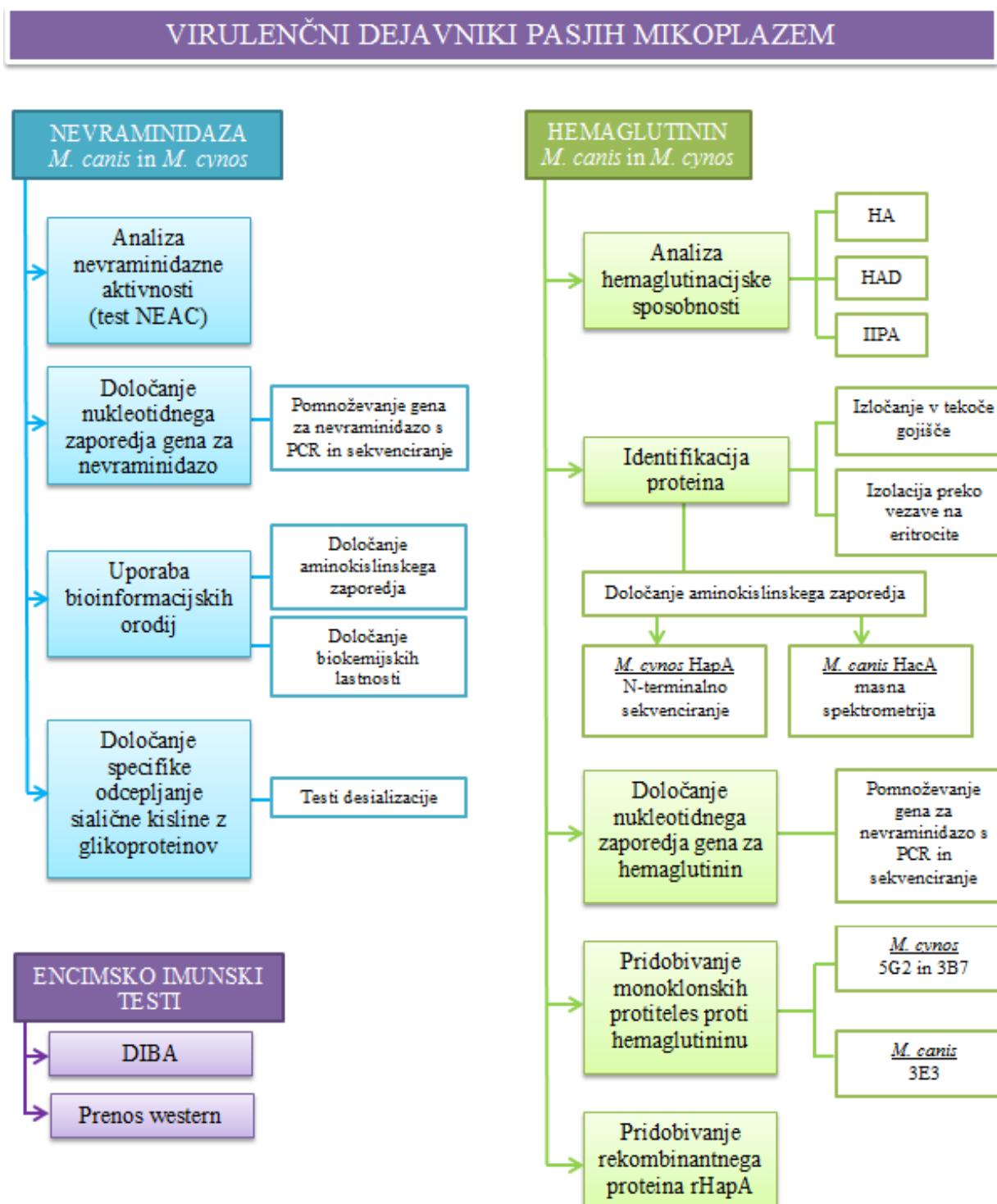
Hvala vsem sodelavcem Katedre za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, brez vas bi bilo dolgčas.

In seveda iskrena hvala moji družini, da ste prenašali moja nerganja in se skupaj z mano veselili vseh uspehov na poti.

PRILOGE

Priloga A

Shematski prikaz poteka in metod dela.



Priloga B

Prikaz postavitve začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje dveh genov za nevraminidazo pri sevih *M. cynos*.

CAATT CAG CAAT ATTTAGT ATTA ACT AAAT ATTTTTCTTT ATTTATA AAAA ATT ATT ATT AAAA
TCATCTAAAATTG TAAATTTAATTGTTTCAGATGCTAGTTTGAAAAA AAAAAAAGC AT Cy_Neu 1F
TGGTAAATTATTCGCACTAT ATTGTAGTGCTAAAAGTTAAAATAATAAACTATCACAGAAATCTCTTA
GAGAAATATATCATAGGAAATAACATATAATTCTAT **ATG** AATAATATTGAATT TTAAACAAGCA
AGCGTAAAATTATTAATATTAAAAAGTATTCAAACACTGAATACAAAATAAAATATTATGTA
GTAAGATTCTGCAGGTTCAAATGAACATATCAAAGTATTATTATAATACAAAAGCTGCATAGTAA
ATTAAATAATAGTAAACAAAGCGCAATTGTTATTAAAAGATAAAATAGTCGCTAAACGCAAGCT
AACACATACTAAAAGATTGGTGACTTCATTATTATAATTAGTGCTCAGCGTTAGTTATTTCAG
TTTCACCAC TCGTCAATACTACTTCAAATAGTATCGATATTAGTTCTAAGGAGCAAAATCAATAT
TTCAATTGGAACTCCAAA ACTAATT CGATTGAAGATGGT GCAAATATGAATT GTGCTTCATATAAA
AATTATGAATATGATATTAAAATTTACCAAAAATTAAAGTTGAAATTATTGATTCAAATAATGAGGTAT
TTTATAGT GAAATAGGTATAATTGATCTAAAATGAAAACAATAATATTAGTTAGATAATTACCTAA Cy_Neu 2F
GCTTAAATTAGACAAATTGTTACAAATTCAAATTACACTTAGTTAGTTAAAACCTT **AGAAGCGCGA** Cy_Neu 1R
AAAGATATCG CTGATTCTCATTA ACTAATAATATTATTAGGCCCTATATTACACTTGATT TTCTA
ATCATTGCAAGTCTTATGAAAAAATTATGTCTTAATGAATT TATCAATCGAAAATATT TAAAT
ACCAACATATGCATTATTAAAAAGGTTATTAAAGAAA ACTATTACCTGAACAAAAGAAAAATTATT
GAGCAATTACTAGATT TAGTAAATAAAA ACTACAAAAGTGTACTTGAATCAAATGATATTAAATTAGGTG
ATAAAGAATTAGTTATTAAACTATCAGATAATAAGAACACCAAGATT TATGAAAGT GATATCTATT
CTTTATT TAAATAAAA ACCATTCAACAAACAAATCAAACAAATGATCCTGAAGCTATT TATTAAAGC
AATAAGGATAAAAGCATTCAATTCACTATTACAAAAGATCCATTATAAGTGCTAACAAACTAGGAAAAG
CAATTCAAATAACAAATT TGATATAAAACGTTATCAAGT GAAACATT ATTGGACATAAAGAAGACGG
AGCTAATACTATCGTATTCTGGAATAATTAAACTAAAAACGGAACATTGATCGAAATGCTGATAAA
AGGTATCAGAATTTCGTGATTATTCAATAATATAACACAAGCTATTAAATTTCATATGATAATGGTA
GAACATGAACTAATCCAAGAGAAATTAAAGTACAATT CCTAGTTAAAATCA **AGGCTTAACGAT** Cy_Neu 3F
CGATGGA ACTATGATAGAAGT AGAATATT CGAAAATGTTCAAATAAAAAGGAACAAAATTATT
TTTGTGATATTTCCTGATAAAACAGGATTACCTCACATAATGGAACAATTGAAACAAAATTA Cy_Neu 2R
ATGGAAAAATTATCTTAGATTGTATACAAGATTAAAAGCAATGATAATTGATGATGAAATTTCATT
TTTAGAAAGAGTTCAAGGAAC TCAAACGTATTAGAAGGGTAATACTTAAA ACTGGAAAAGATATTAAA
AATGCCACTTCATGTATTACCTTGACTTCTGATTATGTTAAATTACTGAAACTAGTG
CAATAACAGGTATTGTTATAAAAATTGAATCTGAATCCGAATTAAATAATCCGAAGTTCTCAAAG
TAAGAAAACAGAATATAGTGTGTTAGATTGCAAATAATAAAATCAAATGTTTATCTAGCGAT
GAGTATGATGAAAGTTAAAATAAGAAAAACTGGTAAAAGTTATTAGCTTTAATAATCATGTTGTAT
CTATTGAAAGCTACGACAATGGAAAACCTGAAAAACCTAACAGATGAATTGATGAAAGATGTTATGAGTC Cy_Neu 4F
ATCTAAAATGCTAAATTCACTGGGACTGCACTGGGAAMCCAATTCAATTAAACATCAAAGATCCTAAA
TTAAATGGAAGAATCTGCTTCAATGTATCAAATAGGAGGGCGGATTGCGCTGCTTATTACTTATA
GTGATGATTATGGTAATTCTGAAAAGACAAAATGTTAGTTCCCTAGAAATTAAACAGAATCATCTAT
GATTGAAAGCAAAGACGGAAGTATTGACTT **CTCAGAAATGATCGCGGATT** TGGTGCTACTACTGCT Cy_Neu 3R
AAACATTGAATTACTAAAAGTGTGATGGTGGAAAACATGAATAAATCAAATGGT GATACTGGTTCTA
ATGGTAAAGATTAAATATTGGGATAAAAACCTTGATGGTAATGTTTCCGGTATTGGATACTTTAA

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B: Prikaz postavitve začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje dveh genov za nevraminidazo pri sevih *M. cynos*.

MCYN_RS01800
TTTAAAAGGAAAAGATTATTTATATTCTCTATTGCAAAAGACAATATAAGACGAAATGATTCTTATT
ATTACTGATAGTACTTTAATGATGCTACAGAATTATTGATTATGACTTATGTTGAATCAAGGAAACAA
AAAATGAACATTTGTTATAGTTATGCATTAACAATTGATGAAGAAAAGATTATGTTGACATTTATC
AATATATGAAGCTCGGAAAAACTAGGGTTCACGGGAAACCTAATGGCGATGGTTACCTGAATGAGAA
AAGCGCAGACCACAAGCTGATGAAATTCAAGTTGATAGATTCCGTATCTGACTTAAAGACCAAAAA [TAA]
CACTTATCTCTGAAAAATATCAACATTAAAAGTGTGATATT [TTGGTGCATTATTATAGTTTCAGA] Cy_Neu 5F
TTTATTTAACACAAAAGTAACTAAAATTACTATATGAAAGTGGTTAGTTACTTTAGATTAATTTC Cy_Neu 4R
AATTATATATTGGTCTTTTATATTAGATTATTATTTAGAGATATTGTTTTATAATTATCAAT
TTTGTTTATTAGTGTAGAAAATTAAATAATAAAACCATTATTATGTTATAAAAATGATGTTAATT
TTGAAATGTAAATTAAATTTTATTATAACTTTAGTTAGTATTAAAGAGTATATAAAATATTTCTAC
TATAGACAATTTTAGAGAAATTAAATAAAATATAATTAAATTATGAGTAATATATTAAATT
TATTAAACAAATTAGTGTAAAATTATATTAAACAAATTGTAAGGTTCTGAGACAAAAATT
AAGGTTTGTAAATAAAATTCTGTTAGCTCTAAAAAGCTCATCAGAACATTAGTGTAGTATAAAA
AAAATACATAATAAAATTAAATGATAGCAAAACTAAAGCGCAATTAGTTAATATAAGGGAAAAATAAATA
CTAAACTCAACATAAACACTCGAAGAAAATTATAGTTAGTCACTATTATTAGTGCTCAGTACT
AGTTATTATTCAGTTTTCTA [CTCGTGCAGCTTTATTCAA] AATAAGAGCATATATGATAAGGCT Cy_Neu 5R
AATAATAGTAAATATAATATAATCGAAACACCAAGACTAATTCAATTGAAACCGTAAAAACATC
AATTGTAGCGAGCTATAAGAATTATGATCCTAAATTATTAGTAAAGTTAGAATTGAACATT
AAATTCAAAAAATGAGATCTTTATAGTGTCCAGGTATTAACTCAAAAGATAAAACTATAGTTT
GCTTAGATAAGTTACCTAAGGATACGATTATACATTAGATCAATTAAATATTAGAACAAAAAAAGA Cy_Neu 6F
TTAGTGAATTCAACACAAAGATT [ATG] TTAATACTAAGTCATTAATTAACTCAATCTAAGTCATC
AGCAAAATTATATGATAATAATTATGTTTAATGAATCTAGCAATTGAAAATACTTAATATTCAACA
CAAAAATTATTAAACGAGGTACTTAAAGAAGATTATTACCTGAACAAAAAGAAAAATTATTGATT
TATTAGATTAGTAAATAAAACTATAAAAGCGTACTTGAATCAAATAAAATTAAATTAGGTGATAAAGA
ATTAGTTATTAAATTATCAAATAGCAAAGATAAAAATTCTGAAAAAGATGTATTATTTCATCTTA
AATAGCAAAACTACTCAGCAACAAATCAAACAAATGATCCTGAAGCTATTAAAGTAATAAGGATA
AAAGTATTCAATTCACTATTACAAAAGATCCATTATAAGTGTCAACAAACTAGGAAAGCAATTCAAAA
TAACAAATTGATATAAAACGTTATCAAGTGAACATTATTGGACATAATGAAGACGGAGCTAATACT
TATCGTATTCCCTGGAATAATTAAACTTAAACCGAACATTGATCGCTAATGCTGATAAACGTTATGATA
GCCTAGATGACTTAGGTCAAAACATAACGCAAGCTATTAAATTTCATATGATAATTGAGAACATGAAC
TAAACCAAAAGAAATTAAAGTACAATACCTAGCTTAAATAATCAAGGTCTGTAATTGATGGAGTA
ATGCAAGAAATTGAATATCTGATACAAACTAATACCAAAAAACAAAATTATTATTCTTAGTAGATT
TATTTCGGCTAAATTGGAATTAAACATTAAATAATAAAAGGTGGGAATCCATGAGTTACAATTGACAA Cy_Neu 7F
AAAAAATTATCTTAAATTGTGAACAAGGAACAA [TAGCAAATTGGAGGGCAATT] CACTATTAGAAAGAGTT Cy_Neu 6R
GTAGGAACACTAAATTGATATAGACCGCTAATCTTAAAGTAAACTTAAATTGTTACTTCAT
CTGATCTAGCTCCAACTAATGATTATGTTGATTTAAACTATCATACTGAGACTAATTCAATAACCGGTAT
TGTTTATAATAATTCAATCTGAATCCGAATTATAAAACCGCAATTATTAGAATCTAAAAGTCTAAT
TATAGTGTGTTAGATGATGGTGAAGATTCAAAATTAAATTGAGTTAATGATTATAGTATCTATTG
AAAGTTATGATGATGGACAAACTTGAACAGGTTAAACTGGATTATGATGATTCTTTCTAAATTATA
TAAGGACTCGAAATTATTGGAACAGCAGCTCGGAAACCCAATTCAATTAAACATCAAAAGATCCTAAA
TTAAATGGAAGAATAATTGTCCTGTATATGGATATTGAGTTAATGCTGATAACACATATTATTTAGCGATG
ATTGGAGGAAATGATGGACTATTGACTTAAAGAACACAAAAGGTGGTAATCATTAAATTTCG
ATAAGTACAGATGGCGCAACACTTGAATAA [CCAGATGAAAGAATAATCAATTGCTA] Cy_Neu 8F
AAAATAGTAATACAAAAAGAACAAATCAGGAAACGTTCTGGTATAGGATATTAAATTAAATTAAAGA

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B: Prikaz postavitve začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje dveh genov za nevraminidazo pri sevih *M. cynos*.

MCYN_RS01805 GAAAGACTATTTATTTTCAACTCCAAAAAAACAAAGAAGAGATGGTCATTATATA TTGCTGATAAA Cy_Neu 7R
ACATTTAATGACG TTGTAGAAGTATTTGATTATGATTTAGTAATAAAAATCAAGAAGAACATTTGTTT
ATAGTTATGCATTAACAATTGGCAAACATAATGAATATGTCGACGTTGAGTGGTATATGAGTCATCATC
AAAAACAAAAATCCCAGATAATAAGCAACCCCACGATAGTGATAGAACTTGGCTGAGGAAATTCAAGTT
GATAGATTCCGTATTCGATTAAAAGACCAAAA TAA AAAAGCACGTAAGTGCTTTTATGATCGTCTA
TTACCTAAATAGCCGTATTAAGCGTCTAAAATTGCATCTGTCATAGATTTGGTAAATTATCAT
TACCACTAGTACGATAATAAATATAAGCTAATAATTGATCTTGTCAATAGTTGCTAAAAGTTGATTTGC
GCTTCTATTCCTACTATAAATTCTAAATTATAGTTCCACTAGAACGCTCCAATGCCCTTTTA
TGGTTATATGTTAATGAATTAAATTCATGTTGATATTTGTTGCAC TATTAAATGCAGTCCCTAATG
CGGTAACAAATGTGCTTTAAATCTAACCAAAAAAGT TTCAAAATGCTCTCCGCTTAAAGCTTATC Cy_Neu 8R
GTGTCCGAATCATAAAACAAGTGTGGCAAGTCTAACATTGCTTATATTGTTATTTCTTTATTTA
TTAGAATTATAATTATTAGCTTGTGAATCATATCACGGAATTGGTTAAATAATGTAGCCA

Priloga C

Poravnava nukleotidnih zaporedij *hapA* podobnih genov pri različnih sevih *M. cynos*.

Cy2253	-----
H831	-----
Cy2297	-----
Cy896	-----
Cy1334	-----
Cy2117	-----
Cy105	-----
Cy1046	-----
Cy248	-----
Cy2155	-----
0308	AAATCTTTGGAAATTTTAAAATGAAAAAAGGAACCTGTTCGTTGGAA 60
Cy2296	-----
Cy2716	-----
Cy1478	-----
Cy2002	-----
Cy1049	-----
Cy2651	-----
 Cy2253	-----
H831	-----ACTAAAATTTCTCGTACTACATAACAAA 28
Cy2297	-----
Cy896	---ATAAAATCGATAAGTTTACAATGATTGACACTAAAATTTCTCGTACTACATAACATA 57
Cy1334	-----
Cy2117	-----
Cy105	-----TTCTCGTACTACATAACATA 19
Cy1046	-----CTAAAATTTCTCGTACTACATAACACA 27
Cy248	-----
Cy2155	-----
0308	AATAAATTGATAAAATTTACAATGATTGATTACTAAAATTTCTCGTACTACATAACACA 120
Cy2296	-----
Cy2716	-----
Cy1478	-----TACAAAATACAAA 13
Cy2002	-----TAAAATTTCTCGTACTACATAACACA 26
Cy1049	-----AATTTCTCGTACTACATAACACA 23
Cy2651	-----CTAAAATTTCTCGTACTACATAACACA 27
 Cy2253	-----AATCTAT-ATTAAGTATTTAACAAATT-TAGTATTAAGGAGAATAA 47
H831	ACTAATTATTAATCTATTATAAGTATTTAACAA-TTTT-AAGTATTAAGGAGAATAA 86
Cy2297	-----AATCTAT-ATTAAGTATTTAACAA-TCAATT-TAGTATTAAGGAGAATAA 46
Cy896	ACTAATTATTAATCTATTATAAGTATTTAACAAATT-TAGTATTAAGGAGAATAA 116
Cy1334	---AATTATTAATCTAT-ATTAAGTATTTAACAAATT-TAGTATTAAGGAGAATAA 55
Cy2117	-----ATCTAT-ATTAAGTATTTAACAAATT-TAGTATTAAGGAGAATAA 46
Cy105	ACTAATTATTAATCTAT-ATTAAGTATTTAACAAATT-TAGTATTAAGGAGAATAA 78
Cy1046	ACTAATTATTAATCTAT-ATTAAGTATTTAACAAATT-TAGTATTAAGGAGAATAA 86
Cy248	-----TAT-ATTAAGTATTTAACAAATT-TAGTATTAAGGAGAATAA 43
Cy2155	-----AATCTAT-ATTAAGTATTTAACAAATT-TAGTATTAAGGAGAATAA 47
0308	ACTAATTATTAATCTAT-ATTAAGTATTTAACAAATT-TAGTATTAAGGAGAATAA 178
Cy2296	-----TTTT-AAGTATTAAGGAGAATAA 22
Cy2716	-----AT-ATTAAGTATTTAACAAATT-TAGTATTAAGGAGAATAA 42
Cy1478	ACTAATTATTAATCTATTATAAGTATTTAACAA-TTTT-AAGTATTAAGGAGAATAA 71
Cy2002	ACTAATTATTAATCTAT-ATTAAGTATTTAACAAATT-TAGTATTAAGGAGAATAA 85
Cy1049	ACTAATTATTAATCTAT-ATTAAGTATTTAACAAATT-TAGTATTAAGGAGAATAA 82
Cy2651	ACTAATTATTAATCTAT-ATTAAGTATTTAACAAATT-TAGTATTAAGGAGAATAA 85

***** *****

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C: Poravnavo nukleotidnih zaporedij *hapA* podobnih genov pri različnih sevih *M. cynos*.

Cy2253	TGAATAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	107
H831	TGAGTAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	146
Cy2297	TGAATAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	106
Cy896	TGAATAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	176
Cy1334	TGAATAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	115
Cy2117	TGAATAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	106
Cy105	TGAATAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	138
Cy1046	TGAATAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	146
Cy248	TGAATAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	103
Cy2155	TGAATAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	107
0308	TGAATAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	238
Cy2296	TGAATAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	82
Cy2716	TGAATAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	102
Cy1478	TGAGTAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	131
Cy2002	TGAATAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	145
Cy1049	TGAATAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	142
Cy2651	TGAATAATACAAGAAAATTTTACTGGCTTGATTATTCAACATTAATTG	145

Cy2253	GTCAGTGTGTTGCTTGCTAA--AACCCCTAGTCCAAAAGATTCTAACACAGAAG	164
H831	GTCAGTGTGGTAGCTTGCTAAATAAAACCTAAAACAAGTATTCTAGCGCAGAAG	206
Cy2297	GTCAGTGTGTTGCTTGCTAA--AACCCCTAGTCCAAAAGATTCTAACACAGAAG	163
Cy896	GTCAGTGTGGTTGCTTGCTAA--AACCCCTAGTCCAAAAGATTCTAACACAGAAG	233
Cy1334	GTCAGTGTGGTTGCTTGCTAA--AACCCCTAGTCCAAAAGATTCTAACACAGAAG	172
Cy2117	GTCAGTGTGGTTGCTTGCTAA--AACCCCTAGTCCAAAAGATTCTAACACAGAAG	163
Cy105	GTCAGTGTGGTTGCTTGCTG-TAA--AACCCCTAGTCCAAAAGATTCTAGCACAGAAG	194
Cy1046	GTCAGTGTGGTTGCTTGCTAA--AACCCCTAGTCCAAAAGATTCTAACACAGAAG	203
Cy248	GTCAGTGTGGTTGCTTGCTAA--AACCCCTAGTCCAAAAGATTCTAACACAGAAG	160
Cy2155	GTCAGTGTGGTTGCTTGCTAA--AACCCCTAGTCCAAAAGATTCTAGCACAGAAG	164
0308	GTCAGTGTGGTTGCTTGCTAA--AACCCCTAGTCCAAAAGATTCTAGCACAGAAG	295
Cy2296	GTCAGTGTGGTTGCTTGCTAA--AACCCCTAGTCCAAAAGATTCTAGCACAGAAG	139
Cy2716	GTCAGTGTGGTTGCTTGCTAA--AACCCCTAGTCCAAAAGATTCTAGCACAGAAG	159
Cy1478	GTCAGTGTGGTTGCTTGCTAA-----TA-----AGAAG	163
Cy2002	GTCAGTGTGGTTGCTTGCTAA--AACCCCTAGTCCAAAAGATTCTAACACAGAAG	202
Cy1049	GTCAGTGTGGTTGCTTGCTAA--AACCCCTAGTCCAAAAGATTCTAACCGCAGAAA	199
Cy2651	GTCAGTGTGGTTGCTTGCTAA--AACCCCTAGTCCAAAAGATTCTAGCACAGAAG	202

Cy2253	CAATAGATCAAATAATCAAGGAATTCAACAGCACCAGAACAGGAAACCTGAA	224
H831	CAATAGATCAAACAATAATCAAGGAATTCAACAGCACCAGAACAGGAAACCTGAA	266
Cy2297	CAATAGATCAAATAATCAAGGAATTCAACAGCACCAGAACAGGAAACCTGAA	223
Cy896	CAATAGATCAAATAATCAAGGAATTCAACAGCACCAGAACAGGAAACCTGAA	293
Cy1334	CAATAGATCAAGATAATAATCAAGGAATTCAACTACACCAGAACAGGAAACCTGAA	232
Cy2117	CAATAGATCAAGATAATAATCAAGGAATTCAACTACACCAGAACAGGAAACCTGAA	223
Cy105	CAATAGATCAAACAATAATCAAGGAATTCAACTACACCAGAACAGGAAACCTGAA	254
Cy1046	CAATAGATCAAGATAATAATCAAGGAATTCAACTACACCAGAACAGGAAACCTGAA	263
Cy248	CAATAGATCAAATAATCAAGGAATTCAACTACACCAGAACAGGAAACCTGAA	220
Cy2155	CAATAGATCAAACAATAATCAAGGAATTCAACTACACCAGAACAGGAAACCTGAA	224
0308	CAATAGATCAAACAATAATCAAGGAATTCAACTACACCAGAACAGGAAACCTGAA	355
Cy2296	CAATAGATCAAACAATAATCAAGGAATTCAACTACACCAGAACAGGAAACCTGAA	199
Cy2716	CAATAGATCAAACAATAATCAAGGAATTCAACTACACCAGAACAGGAAACCTGAA	219
Cy1478	CAATAGATCAAACAATAATCAAGGAATTCAACTACACCAGAACAGGAAACCTGAA	223
Cy2002	CAATAGATCAAACAATAATCAAGGAATTCAACTACACCAGAACAGGAAACCTGAA	262
Cy1049	CAATAGATCAAACAATAATCAAGGAATTCAACTACACCAGAGC-----	244
Cy2651	CAATAGATCAAACAATAATCAAGGAATTCAACTACACCAGAACAGGAAACCTGAA	262

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C: Poravnavo nukleotidnih zaporedij *hapA* podobnih genov pri različnih sevih *M. cynos*.

Cy2253	TGCCACAAAATCCTGTACCAAGAACAGATCATATAATCAAGAAAAACCTGAGACTCCAA	284
H831	TGCCACAAAATCCTGTACCAAGAACAGATCATATAATCAAGAAAAACCTGAGACTCCAA	326
Cy2297	TGCCACAAAATCCTGTACCAAGAACAGATCATATAATCAAGAAAAACCTGAGACTCCAA	283
Cy896	TGCCACAAAATCCTGTACCAAGAACAGATCATATAATCAAGAAAAACCTGAGACTCCAA	353
Cy1334	TGCCACAAAATCCTGCACCAAGAACAGATCATATAATCAAGAAAAACCTGAGACTCCAA	292
Cy2117	TGCCACAAAATCCTGCACCAAGAACAGATCATATAATCAAGAAAAACCTGAGACTCCAA	283
Cy105	TGCCACAAAATCCTGCACCAAGAACAGATCATATAATCAAGAAAAACCTGAGACTCCAA	314
Cy1046	TGCCACAAAATCCTGCACCAAGAACAGATCATATAATCAAGAAAAACCTGAGACTCCAA	323
Cy248	TGCCACAAAATCCTGCACCAAGAACAGATCATATAATCAAGAAAAACCTGAGGCTCCAA	280
Cy2155	TGCCACAAAATCCAACCCCAGAACAGATCATATAATCAAGAAAAACCTGAGACTCCAA	284
0308	TGCCACAAAATCCTGCACCAAGAACAGATCATATAATCAAGAAAAACCTGAGACTCCAA	415
Cy2296	TGCCACAAAATCCTACCCAGAACAGATCATATAATCAAGAAAAACCTGAGACTCCAA	259
Cy2716	TGCCACAAAATCCTACCCAGAACAGATCATATAATCAAGAAAAACCTGAGACTCCAA	279
Cy1478	TGCCACAAAATCCAACCCCAGAACAGATCATATAATCAAGAAAAACCTGAGACTCCAA	283
Cy2002	TGCCACAAAATCCAACCCCAGAACAGATCATATAATCAAGAGAACCTGAGACTCCAA	322
Cy1049	-----AAGAAAAACCTGAGGCTCCAA	265
Cy2651	TGCCACAAAATCCTGCACCAAGAACAGATCATATTATCAAGAAAAACCTGAGACTCCAA	322

***** * * * * *****

Cy2253	AAGAAGGCACTCCTGCGCCAGATGCACCTAGCGCACCTACTCCAGAAATGCCTAAAGACA	344
H831	AAGAAGGCACTCCTGCGCCAGATGCACCTAGCGCACCTACTCCAGAAATGCCTAAAGACA	386
Cy2297	AAGAAGGCACTCCTGCGCCAGATGCACCTAGCGCACCTACTCCAGAAATGCCTAAAGACA	343
Cy896	AAGAAGGCACTCCTGCGCCAGATGCACCTAGCGCACCTACTCCAGAAATGCCTAAAGACA	413
Cy1334	AAGAAGGTACTCCTGCACCAAGATGCACCTAGCGCACCTACTCCA-----	336
Cy2117	AAGAAGGTACTCCTGCACCAAGATGCACCTAGCGCACCTACTCCA-----	327
Cy105	AAGAAGGCACTCCTGCGCCAGATGCACCTAGCGCACCTACTCCA-----	358
Cy1046	AAGAAGGTACTCCTGCACCAAGATGCACCTAGCGCACCTACTCCA-----	367
Cy248	AAGAAGGTACTCCTGCGCCAGATGCACCTAGCGCACCTACTCCA-----	324
Cy2155	AAGAAGGCACTCCTGCGCCAGATGCACCTAGCGCACCTACTCCA-----	328
0308	AAGAAGGCACTCCTGCGCCAGATGCACCTAGCGCACCTACTCCA-----	459
Cy2296	AAGAAGGCACTCCTGCGCCAGATGCACCTAGCGCACCTACTCCA-----	303
Cy2716	AAGAAGGCACTCCTGCGCCAGATGCACCTAGCGCACCTACTCCA-----	323
Cy1478	AAGAAGGCACTCCTGCGCCAGATGCACCTAGCGCACCTACTCCA-----	327
Cy2002	AAGAAGGCACTCCTGCGCCAGATGCACCTAGCGCACCTACTCCA-----	366
Cy1049	AAGAAGGTACTCCTGCGCCAGATGCGCTAGCACACCTACTCCAGAAATGCCTAAAGACA	325
Cy2651	AAGAAGGCACTCCTGCGCCAGATGCACCTAGCGCACCTACTCCAGAA-----	369

***** ***** ***** ***** *****

Cy2253	CTCCAGAACAAAGTGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	404
H831	CTCCAGAACAAAGTGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	446
Cy2297	CTCCAGAACAAAGTGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	403
Cy896	CTCCAGAACAAAGTGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	473
Cy1334	-----GAACAAAATGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	391
Cy2117	-----GAACAAAATGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	382
Cy105	-----GAACAAAATGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	413
Cy1046	-----GAACAAAATGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	422
Cy248	-----GAACAAAATGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	379
Cy2155	-----GAACAAAATGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	383
0308	-----GAACAAAATGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	514
Cy2296	-----GAACAAAATGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	358
Cy2716	-----GAACAAAATGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	378
Cy1478	-----GAACAAAATGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	382
Cy2002	-----GAACAAAATGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	421
Cy1049	CTCCAGAACAAAGTGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	385
Cy2651	-----CAAATGGTAATACTGGTCAAAGTAATGACTCAAAAGGTAAATACACAAGTC	421

***** ***** ***** ***** *****

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C: Poravnavo nukleotidnih zaporedij *hapA* podobnih genov pri različnih sevih *M. cynos*.

Cy2253	AAAATAAAGGTGAAGCAGGCATGAATAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATGACAC	464
H831	AAAATAAAGGTGAAGCAGGCATGAATAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATGACAC	506
Cy2297	AAAATAAAGGTGAAGCAGGCATGAATAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATGACAC	463
Cy896	AAAATAAAGGTGAAGCAGGCATGAATAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATGACAC	533
Cy1334	AAAATAAAGCGAAGCAGGAATGAACAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATGACAC	451
Cy2117	AAAATAAAGCGAAGCAGGAATGAACAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATGACAC	442
Cy105	AAAATAAAGGTGAAGCAGGCATGAACAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATGACAC	473
Cy1046	AAAATAAAGCGAAGCAGGAATGAACAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATGACAC	482
Cy248	AAAATAAAGGTGAAGCAGGTATGAACAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATGACAC	439
Cy2155	AAAATAAAGGTGAAGCAGGCATGAATAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATGACAC	443
0308	AAAATAAAGGTGAAACAGGCATGAACAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATGACAC	574
Cy2296	AAAATAAAGGTGAAGCAGGCATGAACAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATGACAC	418
Cy2716	AAAATAAAGGTGAAGCAGGCATGAATAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATGACAC	438
Cy1478	AAAATAAAGGTGAAGCAGGCATGAACAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATGACAC	442
Cy2002	AAAATAAAGGTGAAACAGGCATGAATAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATGACAC	481
Cy1049	AAAATAAAGGTGAAGCAGGCATGAGCAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATTACAC	445
Cy2651	AAAATAAAGGTGAAACAGGCATGAACAATTCAAATCACGAAAATAATAATGAAATGACAC	481

Cy2253	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGATGGAATTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	524
H831	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGATGGAATTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	566
Cy2297	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGATGGAATTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	523
Cy896	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGATGGAATTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	593
Cy1334	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGATGGAATTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	511
Cy2117	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGATGGAATTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	502
Cy105	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGGTGGAATTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	533
Cy1046	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGATGGAATTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	542
Cy248	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGATGGAATTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	499
Cy2155	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGATGGAACTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	503
0308	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGATGGAATTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	634
Cy2296	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGATGGAATTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	478
Cy2716	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGATGGAACTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	498
Cy1478	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGATGGAATTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	502
Cy2002	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGATGGAATTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	541
Cy1049	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGATGGAATTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	505
Cy2651	CGAAAGTTACTGTTGAAGCAAATCGATGGAATTATTGTTAACGTGAGAAAAACTCCCTT	541

Cy2253	ATCCTCAAAAGATGCGCTGCTAAGGAACTTTAAAAACGAAATTAAACTATTAGTA	584
H831	ATCCTCAAAAGATGCGCTGCTAAGGAACTTTAAAAACGAAATTAAACTATTAGTA	626
Cy2297	ATCCTCAAAAGATGCGCTGCTAAGGAACTTTAAAAACGAAATTAAACTATTAGTA	583
Cy896	ATCCTCAAAAGATGCGCTGCTAAGGAACTTTAAAAACGAAATTAAACTATTAGTA	653
Cy1334	ATCCTCAAAAGATGCACCTGCTAAGGAACTTTAAAAATGAAATTAAACTATTAGTA	571
Cy2117	ATCCTCAAAAGATGCACCTGCTAAGGAACTTTAAAAATGAAATTAAACTATTAGTA	562
Cy105	ATCCTCAAAAGATGCACCTGCTAAGGAACTTTAAAAATGAAATTAAACTATTAGTA	593
Cy1046	ATCCTCAAAAGATGCACCTGCTAAGGAACTTTAAAAATGAAATTAAACTATTAGTA	602
Cy248	ATCCTCAAAAGATGCACCTGCTAAGGAACTTTAAAAATGAAATTAAACTATTAGTA	559
Cy2155	ATCCTCAAAAGATGCACCTGCTAAGGAACTTTAAAAATGAAATTAAACTATTAGTA	563
0308	ATCCTCAAAAGATGCACCTGCTAAGGAACTTTAAAAATGAAATTAAACTATTAGTA	694
Cy2296	ATCCTCAAAAGATGCGCCGCTAAGGAACTTTAAAAATGAAATTAAACTATTAGTA	538
Cy2716	ATCCTCAAAAGATGCACCTGCTAAGGAACTTTAAAAATGAAATTAAACTATTAGTA	558
Cy1478	ATCCTCAAAAGATGCACCTGCTAAGGAACTTTAAAAATGAAATTAAACTATTAGTA	562
Cy2002	ATCCTCAAAAGATGCACCTGCTAAGGAACTTTAAAAATGAAATTAAACTATTAGTA	601
Cy1049	ATCCTCAAAAGATGCACCTGCTAAGGAACTTTAAAAATGAAATTAAACTATTAGTA	565
Cy2651	ATCCTCAAAAGATGCACCTGCTAAGGAACTTTAAAAATGAAATTAAACTATTAGTA	601

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C: Poravnavo nukleotidnih zaporedij *hapA* podobnih genov pri različnih sevih *M. cynos*.

Cy2253	AAAAATCAGATACAACGTGAGGATAAAAAACTTGGAGGAATTAAGTGATTAAATAAAAAAC	644
H831	AAAAATCAGATACAACGTGAGGATAAAAAACTTGGAGGAATTAAGTGATTAAATAAAAAAC	686
Cy2297	AAAAATCAGATACAACGTGAGGATAAAAAACTTGGAGGAATTAAGTGATTAAATAAAAAAC	643
Cy896	AAAAATCAGATACAACGTGAGGATAAAAAACTTGGAGGAATTAAGTGATTAAATAAAAAAC	713
Cy1334	AAAAATCAGATACAACGTGAGGATAAAAAACTTGGAGGAATTAAGCGATTAAATAAAAAAC	631
Cy2117	AAAAATCAGATACAACGTGAGGATAAAAAACTTGGAGGAATTAAGCGATTAAATAAAAAAC	622
Cy105	AAAAAAACAGGTACAACGTGAGGATAAAAAACTTGAAGGAATTAAGCGATTAAATAAAAAAC	653
Cy1046	AAAAATCAGATACAACGTGAGGATAAAAAACTTGGAGGAATTAAGCGATTAAATAAAAAAC	662
Cy248	AAAAATCAGGTACAACGTGAGGATAAAAAACTTGAAGGAATTAAGCGATTAAATAAAAAAC	619
Cy2155	AAAAATCAGATACAACGTGAGGATAAAAAACTTGGAGGAATTAAGCGATTAAATAAAAAAC	623
0308	AAAAATCAGATACAACGTGAGGATAAAAAACTTGGAGGAATTAAGCAATTAAATAAAAAAC	754
Cy2296	AAAAATCAGGTACAACGTGAGGATAAAAAACTTGAAGGAATTAAGCGATTAAATAAAAAAC	598
Cy2716	AAAAATCAGATACAACGTGAGGATAAAAAACTTGGAGGAATTAAGCGATTAAATAAAAAAC	618
Cy1478	AAAAATCAGATACAACGTGAGGATAAAAAACTTGGAGGAATTAAGCGATTAAATAAAAAAC	622
Cy2002	AAAAATCAGATACAACGTGAGGATAAAAAACTTGAAGGAATTAAGCGATTAAATAAAAAAC	661
Cy1049	AAAAATCAGATACAACGTGAGGATAAAAAACTTGGAGGAATTAAGCGATTAAATAAAAAAC	625
Cy2651	AAAAATCAGATACAACGTGAGGATAAAAAACTTGGAGGAATTAAGCAATTAAATAAAAAAC	661
***** * ***** ***** * ***** * ***** * ***** * *****		
Cy2253	TTATCCAATTAAAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	704
H831	TTATCCAATTAAAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	746
Cy2297	TTATCCAATTAAAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	703
Cy896	TTATCCAATTAAAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	773
Cy1334	TTATTCAAATTATAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	691
Cy2117	TTATTCAAATTAAAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	682
Cy105	TTATTCAAATTATAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	713
Cy1046	TTATTCAAATTAAAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	722
Cy248	TTATTCAAATTAAAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	679
Cy2155	TTATTCAAATTAAAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	683
0308	TTATTCAAATTAAAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	814
Cy2296	TTATTCAAATTAAAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	658
Cy2716	TTATTCAAATTAAAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	678
Cy1478	TTATTCAAATTAAAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	682
Cy2002	TTATCCAATTAAAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	721
Cy1049	TTATTCAAATTAAAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	685
Cy2651	TTATTCAAATTAAAGAAGAATTAGATAAAACTATTCAAAATAGATTCCCTAACCTTATC	721
***** * ***** ***** * ***** * ***** * ***** * *****		
Cy2253	CTAATTCAAGAAAAAAATGATATTCCATTAGCAAAAGATTATTAAATCCAAATTAAATT	764
H831	CTAATTCAAGAAAAAAATGATATTCCATTAGCAAAAGATTATTAAATCCAAATTAAATT	806
Cy2297	CTAATTCAAGAAAAAAATGATATTCCATTAGCAAAAGATTATTAAATCCAAATTAAATT	763
Cy896	CTAATTCAAGAAAAAAATGATATTCCATTAGCAAAAGATTATTAAATCCAAATTAAATT	833
Cy1334	CTAATTCAAGAAAAAAATGATATTCCGTAGCAAAAGATTATTAAATCCAAATTAAATT	751
Cy2117	CTAATTCAAGAAAAAAATGATATTCCGTAGCAAAAGATTATTAAATCCAAATTAAATT	742
Cy105	CTAATTCAAGAAAAAAATGATATTCCGTAGCAAAAGATTATTAAATCCAAATTAAATT	773
Cy1046	CTAATTCAAGAAAAAAATGATATTCCGTAGCAAAAGATTATTAAATCCAAATTAAATT	782
Cy248	CTAATTCAAGAAAAAAATGATATTCCATTAGCGAAAGATTATTAAATCCAAATTAAATT	739
Cy2155	CTAATTCAAGAAAAAAATGATATTCCGTAGCAAAAGATTATTAAATCTAAATTAAATT	743
0308	CTAATTCAAGAAAAAAATGATATTCCGTAGCAAAAGATTATTAAATCCAAATTAAATT	874
Cy2296	CTAATTCAAGAAAAAAATGATATTCCATTAGCAAAAGATTATTAAATCCAAATTAAATT	718
Cy2716	CTAATTCAAGAAAAAAATGATATTCCGTAGCAAAAGATTATTAAATCTAAATTAAATT	738
Cy1478	CTAATTCAAGAAAAAAATGATATTCCATTAGCAAAAGATTATTAAATCCAAATTAAATT	742
Cy2002	CTAATTCAAGAAAAAAATGATATTCCGTAGCAAAAGATTATTAAATCCAAATTAAATT	781
Cy1049	CTAAGTCAGAAAAAAATGATATTCCGTAGCAAAAGATTATTAAATCCAAATTAAATT	745
Cy2651	CTAATTCAAGAAAAAAATGATATTCCGTAGCAAAAGATTATTAAATCCAAATTAAATT	781
***** * ***** ***** * ***** * ***** * ***** * *****		

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C: Poravnavo nukleotidnih zaporedij *hapA* podobnih genov pri različnih sevih *M. cynos*.

Cy2253	CATTAACAACTATTGAACAAATAAAGGAACCATACCAAGTGATTAGAGGAAAAAGTTA	824
H831	CATTAACAACTATTGAACAAATAAAGGAACCATACCAAGTGATTAGAGGAAAAAGTTA	866
Cy2297	CATTAACAACTATTGAACAAATAAAGGAACCATACCAAGTGATTAGAGGAAAAAGTTA	823
Cy896	CATTAACAACTATTGAACAAATAAAGGAACCATACCAAGTGATTAGAGGAAAAAGTTA	893
Cy1334	CATTAACAACTATTGAACAAATAAAGGAACCATACCAAGTGATTAGAGGAAAAAGTTA	811
Cy2117	CATTAACAACTATTGAACAAATAAAGGAACCATACCAAGTGATTAGAGGAAAAAGTTA	802
Cy105	CATTAACAACTATTGAACAAATAAAGGAACCATACCAAGTGATTAGAGGAAAAAATT	833
Cy1046	CATTAACAACTATTGAACAAATAAAGGAACCATACCAAGTGATTAGAGGAAAAAGTTA	842
Cy248	CATTAACAACTATTGAACAAATAAAGGAACCATACCAAGTGATTAGAGGAAAAAGTTA	799
Cy2155	CATTAACAACTATTGAACAAATAAAGGAACCATACCAAGTGATTAGAGGAAAAAATT	803
0308	CATTAACAACTATTGAACAAATAAAGGAATCATACCAAGTGATTAGAGGAAAAAATT	934
Cy2296	CATTAACAACTATTGAACAAATAAAGGAACCATACCAAGTGATTAGAGGAAAAAGTTA	778
Cy2716	CATTAACAACTATTGAACAAATAAAGGAACCATACCAAGTGATTAGAGGAAAAAATT	798
Cy1478	CATTAACAACTATTGAACAAATAAAGGAACCATACCAAGTGATTAGAGGAAAAAATT	802
Cy2002	CATTAACAAACAATTGAACAAATAAAGGAACCATACCAAGTGATTAAAAGAAAAAATT	841
Cy1049	CATTAACAACTATTGAACAAATAAAGGAATCATACCAAGTGATTAGAGGAAAAAATT	805
Cy2651	CATTAACAACTATTGAACAAATAAAGGAATCATACCAAGTGATTAGAGGAAAAAATT	841

Cy2253	AAAAGTATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAAAA 884
H831	AAAAGTATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAAAA 926
Cy2297	AAAAGTATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAAAA 883
Cy896	AAAAGTATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAAAA 953
Cy1334	AAAAATATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAAAA 871
Cy2117	AAAAATATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAAAA 862
Cy105	AAAAATATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAGAA 893
Cy1046	AAAAATATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAAAA 902
Cy248	AAAAATATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAAAA 859
Cy2155	AAAAATATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAGAA 863
0308	AAAAATATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAGAA 994
Cy2296	AAAAATATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAAAA 838
Cy2716	AAAAATATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAGAA 858
Cy1478	AAAAATATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAAAA 862
Cy2002	AAAAATATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAAAA 901
Cy1049	AAAAATATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAGAA 865
Cy2651	AAAAATATAATGAAATTGGAAATTAGTTGGTTATTTGAAAAGTCCCAGAAAGAA 901

Cy2253	ATAAAAAAGGATTAAATGCTCGTTAGCCAGATTATATGGCATGACCATAATGCTAATT	944
H831	ATAAAAAAGGATTAAATGCTCGTTAGCCAGATTATATGGCATGACCATAATGCTAATT	986
Cy2297	ATAAAAAAGGATTAAATGCTCGTTAGCCAGATTATATGGCATGACCATAATGCTAATT	943
Cy896	ATAAAAAAGGATTAAATGCTCGTTAGCCAGATTATATGGCATGACCATAATGCTAATT	1013
Cy1334	ATAAAAAAGGATTAAATGCTCGTTAGCCAGATTATATGGCATGACCATAATGCTAATT	931
Cy2117	ATAAAAAAGGATTAAATGCTCGTTAGCCAGATTATATGGCATGACCATAATGCTAATT	922
Cy105	ATAAAAAAGGATTAAATGATCGTTAGCTAGATTATATGGCATGACCATAATGCTAATC	953
Cy1046	ATAAAAAAGGATTAAATGCTCGTTAGCCAGATTATATGGCATGACCATAATGCTAATT	962
Cy248	ATAAAAAAGGATTAAATGCTCGTTAGCCAGATTATATGGCATGACCATAATGCTAATT	919
Cy2155	ATAAAAAAGGATTAAATGATCGTTAGCCAGATTATATGGCATGACCATAATGCTAATC	923
0308	ATAAAAAAGGATTAAATGACCGTTAGCCAGATTATATGGCATGACCATAATGCTAATC	1054
Cy2296	ATAAAAAAGGATTAAATGCTCGTTAGCCAGATTATATGGCATGACCATAATGCTAATT	898
Cy2716	ATAAAAAAGGATTAAATGATCGTTAGCCAGATTATATGGCATGACCATAATGCTAATC	918
Cy1478	ATAAAAAAGGATTAAATGCTCGTTAGCCAGATTATATGGCATGACCATAATGCTAATT	922
Cy2002	ATAAAAAAAGGATAAAATGATCGTTAGCCAGATTATATGGCATGACCATAATGCTA--T	959
Cy1049	ATAAAAAAGGATTAAATGATCGTTAGCTAGATTATATGGCATGACCATAATGCTAATC	925
Cy2651	ATAAAAAAGGATTAAATGACCGTTAGCCAGATTATATGGCATGACCATAATGCTAATC	961
***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****		

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C: Poravnavo nukleotidnih zaporedij *hapA* podobnih genov pri različnih sevih *M. cynos*.

Cy2253	ATACAGAACGGTGAATTAATTGGCAAATTGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTTG 1004
H831	ATACAGAACGGTGAATTAATTGGCAAATTGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTTG 1046
Cy2297	ATACAGAACGGTGAATTAATTGGCAAATTGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTTG 1003
Cy896	ATACAGAACGGTGAATTAATTGGCAAATTGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTTG 1073
Cy1334	ATACAGAACGGTGAATTAATTGGCAAATTGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTTG 991
Cy2117	ATACAGAACGGTGAATTAATTGGCAAATTGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTTG 982
Cy105	ATACAGAACGGTGAATTAATTGGCAAATTGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTCG 1013
Cy1046	ATACAGAACGGTGAATTAATTGGCAAATTGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTCG 1022
Cy248	ATACAGAACGGTGAATTAATTGGCAAATTGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTTG 979
Cy2155	ATACAGAACGGTGAATTAATTGGCAATTGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTCG 983
0308	ATACAGAACGGTGAATTAATTGGCAATTGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTCG 1114
Cy2296	ATACAGAACGGTGAATTAATTGGCAATTGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTTG 958
Cy2716	ATACAGAACGGTGAATTAATTGGCAATTGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTTG 978
Cy1478	ATACAGAACGGTGAATTAATTGGCAATTGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTTG 982
Cy2002	CTACAGAAAAGTGATTAAATTGGCA-TTTACGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTCG 1018
Cy1049	ATACAGAACGGTGAATTAATTGGCAATTGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTCG 985
Cy2651	ATACAGAACGGTGAATTAATTGGCAATTGAGACTGTTAGACAACAAGGATTTGTTG 1021
***** * ***** ***** * * ***** * ***** * ***** * ***** * *	
Cy2253	CTAAAATTAAAGAAATTGAAAAAGATATTGAAACACAAAGGAATATATTGAAA-TAAA 1063
H831	CTAAAATTAAAGAAATTGAAAAAGATAGTTGAAACACAAAGGAATATATTGAAA-TAAA 1105
Cy2297	CTAAAATTAAAGAAATTGAAAAAGATAGTTGAAACACAAAGGAATATATTGAAA-TAAA 1062
Cy896	CTAAAATTAAAGAAATTGAAAAAGATAGTTGAAACACAAAGGAATATATTGAAA-TAAA 1132
Cy1334	CTAAAATTAAAGAAATTGAAAAAGATGTTGAAACACAAAGGAATATATTGAAA-TAAA 1050
Cy2117	CTAAAATTAAAGAAATTGAAAAAGATAGTTGAAACACAAAGGAATATATTGAAA-TAAA 1041
Cy105	CTAAAATTAAAGAAACTTGAAAAAGATGTTGAAACACAAAGGAATATATCGGAAA-TGAA 1072
Cy1046	CTAAAATTAAAGAAACTTGAAAAAGATGTTGAAACACAAAGGAATATATCGGAAA-TGAA 1081
Cy248	CTAAAATTAAAGAAATTGAAAAAGATAGTTGAAACACAAAGGAATATATTGAAA-TAAA 1038
Cy2155	CTAAAATTAAAGAAACTTGAAAAAGATGTTGAAACACAAAGGAATATATCGGAAA-TGAA 1042
0308	CTAAAATTAAAGAAACTTGAAAAAGATGTTGAAACACAAAGGAATATATCGGAAA-TGAA 1173
Cy2296	CTAAAATTAAAGAAATTGAAAAAGATGTTGAAACACAAAGGAATATATCGGAAA-TGAA 1017
Cy2716	CTAAAATTAAAGAAATTGAAAAAGATAGTTGAAACACAAAGGAATATATTGAAA-TGAA 1037
Cy1478	CTAAAATTAAAGAAATTGAAAAAGATAGTTGAAACACAAAGGAATATATTGAAA-TAAA 1041
Cy2002	CTAAAATTAAAGAAACTTGAAAAAGATAATTGAAACACAAAGGAATATATAGGAAAATAAA 1078
Cy1049	CTAAAATTAAAGAAACTTGAAAAAGATGTTGAAACACAAAGGAATATATCGGAAA-TGAA 1044
Cy2651	CTAAAATTAAAGAAATTGAAAAAGATAGTTGAAACACAAAGGAATATATTGAAA-TAAA 1080
***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *** * ***	
Cy2253	GAAGTTAACAAATTCTGTTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1123
H831	GAAGTTAACAAATTCTGTTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1165
Cy2297	GAAGTTAACAAATTCTGTTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1122
Cy896	GAAGTTAACAAATTCTGTTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1192
Cy1334	GAAGTTAACAAATTCTGTTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1110
Cy2117	GAAGTTAACAAATTCTGTTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1101
Cy105	GAAGTTAACAAATTCTGGTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1132
Cy1046	GAAGTTAACAAATTCTGGTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1141
Cy248	GAAGTTAACAAATTCTGTTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1098
Cy2155	GAAGTTAACAAATTCTGGTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1102
0308	GAAGTTAACAAATTCTGGTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1233
Cy2296	GAAGTTAACAAATTCTGGTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1077
Cy2716	GAAGTTAACAAATTCTGGTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1097
Cy1478	GAAGTTAACAAATTCTGTTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1101
Cy2002	GAAGTTAACAAATTCTGTTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1138
Cy1049	GAAGTTAACAAATTCTGGTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1104
Cy2651	GAAGTTAACAAATTCTGTTCAATGAAATTAAACCTGGTATAACTATTGATCAATTA 1140
***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****	

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C: Poravnavo nukleotidnih zaporedij *hapA* podobnih genov pri različnih sevih *M. cynos*.

Cy2253	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAAGCAAAAAGAAGAATCTAAGAAA	1183
H831	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAAGCAAAAAGAAGAATCTAAGAAA	1225
Cy2297	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAAGCAAAAAGAAGAATCTAAGAAA	1182
Cy896	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAAGCAAAAAGAAGAATCTAAGAAA	1252
Cy1334	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAAGCAAAAAGAAGAATCTAAGAAA	1170
Cy2117	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAAGCAAAAAGAAGAATCTAAGAAA	1161
Cy105	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAAGCAAAAAGAAAAATCTAAGAAA	1192
Cy1046	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAAGCAAAAAGAAAAATCTAAGAAA	1201
Cy248	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAGGCAAAAAGAAAAATCTAAGAAA	1158
Cy2155	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAAGCAAAAAGAAAAATCTAAGAAA	1162
0308	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAAGCAAAAAGAAAAATCTAAGAAA	1293
Cy2296	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAAGCAAAAAGAAAAATCTAAGAAA	1137
Cy2716	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAAGCAAAAAGAAAAATCTAAGAAA	1157
Cy1478	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAAGCAAAAAGAAGAATCTAAGAAA	1161
Cy2002	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAAGCAAAAAGAAGAATCTAAGAAA	1198
Cy1049	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAAGCAAAAAGAAAAATCTAAGAAA	1164
Cy2651	AAACAAAAAAATAGAAAAAAATGGTTGAATTAGTTAAAAAAGCAAAAAGAAGAATCTAAGAAA	1200

Cy2253	AATTCTGATGCTAATACACAATCTAATTCAAAACTATGACAGCACAACCAAATTCAA	1243
H831	AATTCTGATGCTAATACACAATCTAATTCAAAACTATGACAGCACAACCAAATTCAA	1285
Cy2297	AATTCTGATGCTAATACACAATCTAATTCAAAACTATGACAGCACAACCAAATTCAA	1242
Cy896	AATTCTGATGCTAATACACAATCTAATTCAAAACTATGACAGCACAACCAAATTCAA	1312
Cy1334	AATTCTGATGCTAATACACAATCTAATTCAAAACTATGACAGCAAACCAAATTCAA	1230
Cy2117	AATTATGATGATT-TATTCAACGT--TTAAGATACTGCGAGAGTAAACCAAATTCAA	1218
Cy105	AATTCTGATGCTAATACACAACCTAATTCAAAACTATGACAGCAAACCAAATTCAA	1252
Cy1046	AATTCTGATGCTAATACACAACCTAATTCAAAACTATGACAGCAAACCAAATTCAA	1261
Cy248	AATTCTGATGCTAATACACAACCTAATTCAAAACTATGACAGCAAACCAAATTCAA	1218
Cy2155	AATTCTGATGCTAATACACAACCTAATTCAAAACTATGACAGCAAACCAAATTCAA	1222
0308	AATTCTGATGCTAATACACAACCTAATTCAAAACTATGACAGCAAACCAAATTCAA	1353
Cy2296	AATTCTGATGCTAATACACAACCTAATTCAAAACTATGACAGCAAACCAAATTCAA	1197
Cy2716	AATTCTGATGCTAGTACACAACCTAATTCAAAACTATGACAGCGAACCAAATTCAA	1217
Cy1478	AATTCTGATGCTAATACACAACCTAATTCAAAACTATGACAGCAAACCAAATTCAA	1221
Cy2002	AATTCTGATGCTAATACACAACCTAATTCAAAACTATGACAGCAAACCAAATTCAA	1258
Cy1049	AATTCTGATGCTAATACACAACCTAATTCAAAACTATGACAGCAAACCAAATTCAA	1224
Cy2651	AATTCTGATGCTAATACACAACCTAATTCAAAACTATGACAGCACAACCAAATTCAA	1258

Cy2253	CAATAATTTAAAAAAGTCATATAGGTGAATATGACTTTTT-ATTTAAATATGCTATT	1302
H831	CAATAATTTAAAAAAGTCATATAGGTGAATATGACTTTTT-ATTTAAATATGCTATT	1344
Cy2297	CAATAATTTAAAAAAGTCATATAGGTGAATATGACTTTTT-ATTTAAATATGCTATT	1301
Cy896	CAATAATTTAAAAAAGTCATATAGGTGAATATGACTTTTT-ATTTAAATATGCTATT	1371
Cy1334	CAATAATTTAAAAAAGTCATATAGGTGAATATGACTTTTT-ATTTAAATATGTTATT	1289
Cy2117	CAATAAA-----	1224
Cy105	CAATAATTTAAAAAAGTCATATAGGTGAATATGACTTTTT-ATTTAAATATGCTATT	1311
Cy1046	CAATAATTTAAAAAAGTCATATAGGTGAATATGACTTTTT-ATTTAAATATGCTATT	1320
Cy248	CAATAATTTAAAAAAGTCATATAGGTGAATATGACTTTTT-ATTTAAATATGCTATT	1277
Cy2155	CAATAATTTAAAAAAGTCATATAGGTGAATATGACTTTTT-ATTTAAATATGCTATT	1281
0308	CAATAATTTAAAAAAGTCATATAGGTGAATATGACTTTTT-ATTTAAATATGCTATT	1412
Cy2296	CAATAATTTAAAAAAGTCATATAGGTAAATATGACTTTTTATTTAAATATGCTATT	1257
Cy2716	CAATAATTTAAAAAAGTCATATAGGTGAATATGACTTTTT-ATTTAAATATGCTATT	1276
Cy1478	CAATAATTTAAAAAAGTCATATAGGTGAATATGACTTTTT-ATTTAAATATGCTATT	1280
Cy2002	CAATAATTTAAAAAAGTCATATAGGTGAATATGACTTTTT-ATTTAAATATGCTATT	1317
Cy1049	CAATAATTTAAAAAAGTCATATAGGTGAATATGACTTTTT-ATTTAAATATGCTATT	1283
Cy2651	CAATAATTTAAAAAAGTCATATAGGTGAATATGACTTTTT-ATTTAAATATGCTATT	1317

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C: Poravnavo nukleotidnih zaporedij *hapA* podobnih genov pri različnih sevih *M. cynos*.

Cy2253	TTTCAAAATCACTAATATATCATAATAAAAATAATTAAATAAAAATATAAGTTAATTCT	1362
H831	TTTCAAAATCACTAATATATCATAATAAAAATAATTAAATAAAAATATAAGTTAATTCT	1404
Cy2297	TTTCAAAATCACTAATATATCATAATAAAAATAATTAAATAAAAATATAAGTTAATTCT	1361
Cy896	TTTCAAAATCACTAATATATCATAATAAAAATAATTAAATAAAAATATAAGTTAATTCT	1431
Cy1334	TTTCAAAATCACTAATATATCATAATAAAAATAATTAAATAAAAATATAAGTTAATTCT	1349
Cy2117	-----	
Cy105	TTTCAAAATCACTAATATATCATAATAAAAATAATTAAATAAAAATATAAGTTCAATTCT	1371
Cy1046	TTTCAAAATCACTAATATATCATAATAAAAATAATTAAATAAAAATATAAGTTCAATTCT	1380
Cy248	TTTCAAAATCACTAATATATCATAATAAAAATAATTAAATAAAAATATAAGTTCAATTCT	1337
Cy2155	TTTCAAAATCACTAATATATCATAATAAAAATAATTAAATAAAAATATAAGTTCAATTCT	1341
0308	TTTCAAAATCACTAATATATCATAATAAAAATAATTAAATAAAAATATAAGTTCAATTCT	1472
Cy2296	TTTCAAAATCACTAATATATCATAATAAAAATAATTAAATAAAAATATAAGTTCAATTCT	1317
Cy2716	TTTCAAAATCACTAATATATCATAATAAAAATAATTAAATAAAAATATAAGTTAATTCT	1336
Cy1478	TTTCAAAATCACTAATATATCATAATAAAAATAATTAAATAAAAATATAAGTTCAATTCT	1340
Cy2002	TTTCAAAATCACTAATATATCATAATAAAAATAATTAAATAAAAATATAAGTTCAATTCT	1377
Cy1049	TTTCAAAATCACTAATATATCATAATAAAAATAATTAAATAAAAATATAAGTTCAATTCT	1343
Cy2651	TTTCAAAATCACTAATATATCATAATAAAAATAATTAAATAAAAATATAAGTTAATTCT	1377
Cy2253	AACTTCAAATGTTAATTATAGTTAAATAAGTTAAATTCAACATTATATCATACTTGCT	1422
H831	AACTTCAAATGTTAATTATAGTTAAATAAGTTAAATTCAACATTATATCATACTTGCT	1464
Cy2297	AACTTCAAATGTTAATTATAGTTAAATAAGTTAAATTCAACATTATATCATACTTGCT	1421
Cy896	AACTTCAAATGTTAATTATAGTTAAATAAGTTAAATTCAACATTATATCATACTTGCT	1491
Cy1334	AACTTCAAATGTTAATTATAGTTAAATAAGTTAAATTCAACATTATATCACAATTTC	1409
Cy2117	-----	
Cy105	AACTTCAAATGTTAATTATAGTTAAATAAGTTAAATTCAACATTATATCACACTTGCT	1431
Cy1046	AACTTCAAATGTTAATTATAGTTAAATAAGTTAAATTCAACATTATATCACACTTGCT	1440
Cy248	AACTTCAAATGTTAATTATAGTTAAATAAGTTAAATTCAACATTATATCACACTTGCT	1396
Cy2155	AACTTCAAATGTTAATTATAGTTAAATAAGTTAAATTCAACATTATATCACACTTGCT	1401
0308	AACTTCAAATGTTAATTATAGTTAAATAAGTTAAATTCAACATTATATCACACTTGCT	1532
Cy2296	AACTTCAAATGTTAATTATAGCTAAATAAGTTAAATTCAACATTATATCACACTTGCT	1377
Cy2716	AACTTCAAATGTTAATTATAGTTAAATAAGTTAAATTCAACATTATATCACACTTGCT	1396
Cy1478	AACTTCAAATGTTAATTATAGTTAAATAAGTTAAATTCAACATTATATCACACTTTCT	1400
Cy2002	AACTTCAAATGTTAATTATAGTTAAATAAGTTAAATTCAACATTATATCACACTTTCT	1437
Cy1049	AACTTCAAATGTTAATTATAGTTAAATAAGTTAAATTCAACATTATATCACACTTGCT	1403
Cy2651	AACTTCAAATGTTAATTATAGTTAAATAAGTTAAATTCAACATTATATCATACTTGCT	1437
Cy2253	AAAAAAAAAAAAA-----GGAACCTGTTCTTTGGAAAATAATTGATAAATT	1477
H831	AAAAAAAAAAAAA-----GGAACCTGTTCGTTGGAAAGTAAATTGATAAATT	1520
Cy2297	AAAAAAAAAAAAA-----GGAACCTGTTCTTTGGAAAGTAAATTGATAAATT	1476
Cy896	AAAAAAAAAAAAA-----GGAACCTGTTCTTTGGAAAGTAAATTGATAAATT	1546
Cy1334	AAAAAAAAAAAAA-----GGAACCTGTTCGTTGGAAAGTAAATTGATAAATT	1465
Cy2117	-----	
Cy105	AAAAAAAAAAAAAAGGGACTTTTTGGAAAAAATTAAATTGATAAATT	1491
Cy1046	AAAAAAAAAAAAAAGAGA--ACTTGTTCTTTGGAAAAGAAAAATTGATAAATT	1498
Cy248	AAAAAAAAAAAAAAGGA--ACTTGTTCTTTGGAAAATAATTGATAAATT	1453
Cy2155	AAAAAAAAAAAAAAGGAATTTTTTGGAAAATAATTGATAAATT	1461
0308	AAAAAAAAAAAAAAGGA--GGAACCTGTTCTTTGGAAAATAATTGATAAATT	1591
Cy2296	AAAAAAAAAAAAA---GGAACCTGTTCTTTGGAAAGTAAATTGATAAATT	1433
Cy2716	AAAAAAAAAAAAA---GGAACCTGTTCTTTGGAAAGTAAATTGATAAATT	1454
Cy1478	AAAAAAAAAAAAA---GGAACCTGTTCGTTGGAAAATAATTGATAAATT	1456
Cy2002	AAAAAAAAAAAAA---GGAACCTGTTCTTTGGAAAATAATTGATAAATT	1496
Cy1049	AAAAAAAAAAAAA---GGAACCTGTTCTTTGGAAAGTAAATTGATAAATT	1461
Cy2651	AAAAAAAAAAAAA---GGAACCTGTTCGTTGGAAAGTAAATTGATAAATT	1492

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C: Poravnavo nukleotidnih zaporedij *hapA* podobnih genov pri različnih sevih *M. cynos*.

Cy2253	ATAA-TGATTGACCACTAAAATTTCTCG-----	1505
H831	ATAA-TGATTGACCACTAAAATTTCTCGTACT-----ACATACAAAA-----CTA	1565
Cy2297	ATAA-TGATTGACCACTAAAATTTCTCGTACT-----ACATACAAAA-----CTA	1521
Cy896	ATAA-TGATTGACCACTAAAATTTCTCGTACT-----ACATACAAAA-----CTA	1591
Cy1334	ATAAGTGATTGACCACTAAAATTTCTCGTACT-----ACATACAAAATACAAAAC	1518
Cy2117	-----	
Cy105	TAAAATTTGGCCCCCTAAATTTTCCGAAC-----ACTTACAAAG-----TTA	1537
Cy1046	-AAAATGTTGACCACTAAATTTTCCGAAC-----ACATACAAAA-----CTA	1543
Cy248	-AAAAT-----GA-----	1460
Cy2155	-AAAATTATTGACCACTAAAATTTCTCGTACT-----ACAAAAA-----	1506
0308	-AAAATTATTGATCACAAAATTTCTCGTCCTCCATACAAAATACAAA-----CTA	1643
Cy2296	ATAA-TGATTGACCACTAAAATTTCTCGTACT-----ACATACATAA-----CAA	1478
Cy2716	ATAA-TGATTGACCACTAAAATTTCTCGTACT-----ACATACAAAA-----CTA	1499
Cy1478	AAAA-TTATTGATCACTAAAATTTCTCGTACT-----ACATACAAAATACAAAAC	1508
Cy2002	AAAA-TTATTGACCCCTAAAATTTCTCGTACT-----ACATACAAA-----CAA	1541
Cy1049	AAAA-TGATTGACCACTAAAATTTCTCGTACT-----ACATACAAAA-----CTA	1506
Cy2651	ATAA-TGATTGACCACTAAAATTTCTCGTACT-----CCATACAAA-----CTA	1537
Cy2253	-----	
H831	ATTATTAAATCTATTATTAAGTATTTTAACATTTAA-----	1603
Cy2297	ATTATTAAATCTATTATTAAGTATTTTAACATTTAAAGTATTA-----	1565
Cy896	ATTATTAAATCTATTATTAATATTTTAACATTTAAAGTATTAAGGAGAATAATGAGTA	1651
Cy1334	ATTATTAAATCTATTATTAAGTATTTTAACATTTAAAGTATTAAGGAGAATAATGAGTA	1578
Cy2117	-----	
Cy105	TTTATAAATTTTATAAATTTTTAAC-----TTAGGGAAAAAGGGCA	1597
Cy1046	ATAATAAAATCTTTATAAATTTTTAAC-----TTAGGGAAAAAGGAGTA	1603
Cy248	-----	
Cy2155	ATTATTAAATCTATTATTAAGTATTTAAC-----ATTTAAGATTAGGGAAA-----	1557
0308	ATTATTAAATCTATTATTAAGTATTTAAC-----ATTTA-----	1680
Cy2296	ATTATTAAATCTAT-ATTAAGTATTTAAC-----TTAGGTATTAAGGAGAATAATGAG-----	1535
Cy2716	ATTATTAAATCTATTATTAAGTATTTAAC-----TTAGGTATTAAGGAGAATAATGAGTA	1559
Cy1478	ATTATTAAATCTATTATTAAGTATTTAAC-----TTAGGTATTAAGGAGAATAATGAGTA	1568
Cy2002	ATTATAAAATCTATTATTAAGTATTTAAC-----TTAGGTATTAAGGAGAATAATGAGTA	1601
Cy1049	ATTATTAAATCTATTATTAAGTATTTAAC-----TTAGGTATTAAGGAGAATAATGAGTA	1566
Cy2651	ATTATTAAATCTATTATTAAGTATTTAAC-----TTAGGTATTAAGGAGAATAATGAGTA	1597
Cy2253	-----	
H831	-----	
Cy2297	-----	
Cy896	AATACAAGAAAATTTAGGGCCTTGGAT-----	1681
Cy1334	AATACAAAAAAATTTAGTGGCTTGGATTAT-----	1611
Cy2117	-----	
Cy105	AACAAAAAAATTTAGGG-----	1618
Cy1046	AATACAAAAAAATTTATTGCCCTTGG-----	1631
Cy248	-----	
Cy2155	-----	
0308	-----	
Cy2296	-----	
Cy2716	AATACAAGAAAATTTAGGGCCTTGG-----	1587
Cy1478	AATACAAGAAAATTTAGGGCCTTGG-----	1596
Cy2002	AATACAAGAAAATTT-----	1617
Cy1049	AATACAAAAAAATTTAGGGCCTTGG-----	1594
Cy2651	AATACAAGAAAATTTAGGGCCTTGGATTACCAATAG	1639

Priloga D:

Poravnava aminokislinskega zaporedja nevraminidaz *M. canis* PG14^T in *M. canis* Larissa.

NEU_LAR	MKKINKKLAVYLLLSGALITSTSLAIYFYANSQKIEKKKSNSFSDSQINGFEFNIPEK H
NEU_PG14	MKKINKKLAVYLLLSGALITSTSLAIYFYANSQKIEKKKSNSFSDSQINGFEFNIPEK D

NEU_LAR	NTFPVNHHNDFIEQPEKSDVKFYNFQFKSDVDDSSFISLNFEGTKLLSESRLQIELE
NEU_PG14	NTFPVNHHNDFIEQPEKSDVKFYNFQFKSDVDDSSFISLNFEGTKLLSESRLQIELE

NEU_LAR	DNNKNLVLDKFKINNENKEV V FDTSDLTNNRKFNVKTITLNDQLIKNDNDIDDDAEKIS
NEU_PG14	DNNKNLVLDKFKINNENKEV I FDTSDLTNNRKFNVKTITLNDQLIKNDNDIDDDAEKIS

NEU_LAR	FSTIPSNTFI V FENSRIIESNENSATIEIELKTQDNIKEISKSAVSLSFAYKNNNSKNYL
NEU_PG14	FSTIPSNTFI D FENSRIIESNENSATIEIELKTQDNIKEISKSAVSLSFAYKNNNSKNYL

NEU_LAR	NITGILNKKQDKIFITANLNNLIHGESYFLEAKAFISKPKGLFYNIINNNYENAFYDFNKS
NEU_PG14	NITGILNKKQDKIFITANLNNLIHGESYFLEAKAFISKPKGLFYNIINNNYENAFYDFNKS

NEU_LAR	NNKEHEFVIHTDSETLFKNNSKF C FEVIGEMK D PFENDQNEIKYHLSGVVLDRKIDFS
NEU_PG14	NNKEHEFVIHTDSETLFKNNSKF E FEVIGEMK S DPFENDQNEIKYHLSGVVLDRKIDFS

NEU_LAR	KINENL R LKFSKVGSEETDVYASKISYDPNENKLSFEIENSNSGDQFILKEIQVKNNETE
NEU_PG14	KINENL K LKFSKVGSEETDVYASKISYDPNENKLSFEIENSNSGDQFILKEIQVKNNETE

NEU_LAR	QFENLDITNVDKLIIYEPIKSLEVDLINSRSWESELLYPSYVFINLKLNWNDEKIEK
NEU_PG14	QFENLDITNVDKLIIYEPIKSLEVDLINSRSWESELLYPSYVFINLKLNWNDEKIEK

NEU_LAR	LLDQLTKDDYSESKNSIKVLNANIYDNYKKIVKNNNVDIDNKIIIILRLSDPADDNFY
NEU_PG14	LLDQLTKDDYSESKNSIKVLNANIYDNYKKIVKNNNVDIDNKIIIILRLSDPADDNFY

NEU_LAR	SQDNНИFYFLNETNKHFNTKDIDEKWDIVNNNTISISMKNPFISSNRNGTAIENDH
NEU_PG14	SQDNНИFYFLNETNKHFNTKDIDEKWDIVNNNTISISMKNPFISSNRNGTAIENDH

NEU_LAR	FKIKRLSSETLFAHNEDGSHS YRIP NVTKLKNGKILSVVDKRA A ENISDYNNSISQVFES
NEU_PG14	FKIKRLSSETLFAHNEDGSHS YRIP NVTKLKNGKILSVVDKRV E ENISDYNNSISQVFES

NEU_LAR	LDGGKWTQNKEILKIAVPKKNNRGIAIDGIITE V EYFDEETQTNKTLHFIVDIFPGTN
NEU_PG14	LDGGKWTQNKEILKIAVPKKNNRGIAIDGIITE I EYFDEETQTNKTLHFIVDIFPGTN

NEU_LAR	TGPHLSSGNPWYIGDQGYLKMWTKLNNRNNFDSRSSVLRVEGRGNWFRRYILPAGVS
NEU_PG14	TGPHLSSGNPWYIGDQGYLKMWTKLNNRNNFDSRSSVLRVEGRGNWFRRYILPAGVS

NEU_LAR	FNNNFTASTQLEETNTYVDMNYHQDTKSISGRVYENVMESDFDD A ALDSKKTEHSVDE
NEU_PG14	FNNNFTASTQLEETNTYVDMNYHQDTKSISGRVYENVMESDFDD M ALDSKKTEHSVDE

se nadaljuje

nadaljevanje priloge D: Poravnavo aminokislinskega zaporedja nevraminidaz *M. canis* PG14^T in *M. canis* Larissa.

NEU_LAR	PRKVTNVNNNTFEPLRNEHAVYALAINSHLATLE	SYDEGRTW	TNLQWIDEKLSRHRNNHK
NEU_PG14	PRKVTNVNNNTFEPLRNEHAVYALAINSHLATLE	SYDEGRTW	TNLQWIDEKLSRHRNNHK

NEU_LAR	FVGTGVGNGIQLKHQANASINGRVIIPMYSMNNNDHYMFFIY	SDDKGKTW	TKYTPNGFKT
NEU_PG14	FVGTGVGNGIQLKHQANASINGRVIIPMYSMNNNDHYMFFIY	SDDKGKTW	TKYTPNGFKT

NEU_LAR	NLSESSFVETEDGTLWFARHTGSFGQNTFRTFISK	STDGGMTW	SSPDNDTSRKGDQM
NEU_PG14	NLSESSFVETEDGTLWFARHTGSFGQNTFRTFISK	STDGGMTW	SSPDNDTSRKGDQM

NEU_LAR	GNPYDANIFSGIDHFRWKNKDYFIFSLSKSAVRNRNGYLFIA DFTENIVELFRYDDNQRE		
NEU_PG14	GNPYDANIFSGIDHFRWKNKDYFIFSLSKSAVRNRNGYLFIA DFTENIVELFRYDDNQRE		

NEU_LAR	HFAYSYALVTNKTEINYIDFISIYEASERFKIIDGGFDNSRPKG GEIQLDKFRLWIKD		
NEU_PG14	HFAYSYALVTNKTEINYIDFISIYEASERFKIIDGGFDNSRPKG GEIQLDKFRLWIKD		

Legenda: Z **rumeno** so v poravnavi označene zamenjave aminokislin. **Okvirji** označujejo lokacijo treh motivov Asp škatev in en RIP motiv.

Priloga E

Poravnava aminokislinskega zaporedja nevraminidaz različnih sevov *M. cynos*.

NEU_896 MNNILNFIKQASVKIYINIKKFQNLNTKIKILCSKISAGFKWTYQSIIINTKSLHSKLN
NEU_2297 MNNILNFIKQASVKIYINIKKFQNLNTKIKILCSKISAGFKW~~S~~YQSIIINTKSLHSKLN
NEU_105 MNNILNFIKQASVKIYINIKKFQNLNTKIKILCSKISAGFKWTYQSIIINTKSLHSKLN
NEU_C142 MNNILNFFKQASVKIYINIKKFQNLNTKIKILCSKISAGFKWTYQSIIINTKSLHSKLN
NEU_H831 MNNILNFIKQASVKIYINIKKFQNLNTKIKILCSKISAGFKWTYQSIIINTKSLHSKLN
NEU_2296 MNNILNFIKQASVKIYINIKKFQNLNTKIKILCSKISAGFKWTYQSIIINTKSLHSKLN
*****:*****:*****:*****:*****:*****:

NEU_896 NSKTKAQFVILKDKIVAKTQAHTKKILVTSLLLISASALAIISVFTRRSILLQNSIDIS
NEU_2297 NSKTKAQFVILKDKIVAKTQAHTKKILVTSLLLISASALVIISVFTRRSILLQNSNDIS
NEU_105 NSKTKAQFVILKDKIVAKTQAHTKKILVTSLLLISASALVIISVFTRRSILLQNSIDIS
NEU_C142 NSKTKAQFVILKDKIVAKTQAHTKKILVTSLLLISASALVIISVFTRRSILLQNSIDIS
NEU_H831 NSKTKAQFVILKDKIVAKTQAHTKKILVTSLLLISASALVIISVFTRRSILLQNSIDIS
NEU_2296 NSKTKAQFVILKDKIVAKTQAHTKKILVTSLLLISASALVIISVFTRRSILLQNSNDIS
*****:*****:*****:*****:

NEU_896 SKEQKSNISIETPKLISIEDGAKYEFVSSYKNYEYDIKNLPKIKVEIIDSNNEVFYSE~~R~~
NEU_2297 SKEQKSNISIETPKLISIEDGAKYEFVSSYKNYEYDIKNLPKIKVEIIDSNNEVFYSE~~I~~
NEU_105 SKEQKSNISIETPKLISIEDGAKYEFVSSYKNYEYDIKNLPKIKVEIIDSNNEVFYSE~~I~~
NEU_C142 SKEQKINISIGTPKLISIEDGAKYEFVSSYKNYEYDIKNLPKIKVEIIDSNNEVFYSE~~I~~
NEU_H831 SKEQKSNISIETPKLISIEDGAKYEFVSSYKNYEYDIKNLPKIKVEIIDSNNEVFYSE~~I~~
NEU_2296 SKEQKSNISIETPKLISIEDGAKYEFVSSYKNYEYDIKNLPKIKVEIIDSNNEVFYSE~~I~~
*****:*****:

NEU_896 IIDPKTKTIIFKLDNLPKLKLDLKVTNNSYTLRLTKNLEARNDIADSSLTYNIILRPIFT
NEU_2297 IIDPKTKTIIFKLDNLPKLKLDLKFTNSNYTLRLTKNLEARNDIADSSLTNNIILGPIFT
NEU_105 IIDPKMKTIIFKLDNLPKLKLDLKFTNSNYTLRLTKNLEARNDIADSSLTNNIILGPIFT
NEU_C142 IIDPKMKTIIFKLDNLPKLKLDLKFTNSNYTLRLVKNLEARNDIADSSLTNNIILGPIFT
NEU_H831 IIDPKTKTIIFKLDNLPKLKLDLKFTNSNYTLRLTKNLEARNDIADSSLTNNIILGPIFT
NEU_2296 IIDPKTKTIIFKLDNLPKLKLDLKFTNSNYTLRLTKNLEARNDIADSSLTNNIILGPIFT
*****:*****:

NEU_896 LDFSKSFASLYEKNYVLMNLSIANIKIPTYALLKKVIKENYLPEQKEIIEQLLDLVNK
NEU_2297 LDFSKSFASLYEKNYVLMNLSIANIFKIPTYALLKKVIKENYLPEQKEIIEQLLDLVNK
NEU_105 LDFSKSFASLYEKNYVLMNLSIANIFKIPTYALLKKVIKENYLPEQKEIIEQLLDLVNK
NEU_C142 LDFSKSFASLYEKNYVLMNLSIANIFKIPTYALLKKVIKENYLPEQKEIIEQLLDLVNK
NEU_H831 LDFSKSFASLYEKNYVLMNLSIANIFKIPTYALLKKVIKENYLPEQKEIIEQLLDLVNK
NEU_2296 LDFSKSFASLYEKNYVLMNLSIANIFKIPTYALLKKVIKENYLPEQKEIIEQLLDLVNK
*****:*****:

NEU_896 NYKSVLESNDI~~G~~LGDKELVIELSDLKQQQDFYESDVYYFILNNKTIQQQNQTNDPEAILL
NEU_2297 NYKSVLESNDI~~G~~LGDKELVIELSDNKEHQDFYESDIYYFILNNKTIQQQNQTNDPEAILL
NEU_105 NYKSVLESNDI~~G~~LGDKELVIELSDNKEHQDFYESDIYYFILNNKTIQQQNQTNDPEAILL
NEU_C142 NYKSVLESNDI~~G~~LGDKELVIELSDNKEHQDFYESDIYYFILNNKTIQQQNQTNDPEAILL
NEU_H831 NYKSVLESNDI~~G~~LGDKELVIELSDNKEHQDFYESDIYYFILNNKTIQQQNQTNDPEAILL
NEU_2296 NYKSVLESNDI~~G~~LGDKELVIELSDKKEHQDFYESDIYYFILNNKTIQQQNQTNDPEAILL
*****:*****:

NEU_896 SSKDKSIQFTITIDPFISANKLWKAIQNNKFDIKRLSSETLFGHKE~~G~~ANT~~YRIPGI~~IKL
NEU_2297 SSKDKSIQFTITKDPFISANKLGKAQNNKFDIKRLSSETLFGHKE~~G~~ANT~~YRIPGI~~IKL
NEU_105 SNKDKSIQFTITKDPFISANKLGKAQNNKFDIKRLSSETLFGHKE~~G~~ANT~~YRIPGI~~IKL
NEU_C142 SNKDKSIQFTITKDPFISANKLGKAQNNKFDIKRLSSETLFGHKE~~G~~ANT~~YRIPGI~~IKL
NEU_H831 SNKDKSIQFTITKDPFISANKLGKAQNNKFDIKRLSSETLFGHKE~~G~~ANT~~YRIPGI~~IKL
NEU_2296 SNKDKSIQFTITKDPFISANKLGKAQNNKFDIKRLSSETLFGHKE~~G~~ANT~~YRIPGI~~IKL
*****:*****:
* . *****:*****:*****:*****:

se nadaljuje

nadaljevanje priloge E: Poravnavna aminokislinskega zaporedja nevraminidaz različnih sevov *M. cynos*.

NEU_896 KNGTLIANAD**R**YQNF**R**DYFNNNITQAIKF**[SYDNGRTW]**TNPREILKVQIPSLKNQGLTIDG
NEU_2297 KNGTLIANAD**K**RYQNF**S**DYFNNNITQAIKF**[SYDNGRTW]**TNPREILKVQIPSLKNQGLTIDG
NEU_105 KNGTLIANAD**K**RYQNF**R**DYFNNNITQAIKF**[SYDNGRTW]**TNPREILKVQIPSLKNQGLTIDG
NEU_C142 KNGTLIANAD**K**RYQNF**R**DYFNNNITQAIKF**[SYDNGRTW]**TNPREILKVQIPSLKNQGLTIDG
NEU_H831 KNGTLIANAD**K**RYQNF**R**DYFNNNITQAIKF**[SYDNGRTW]**TNPREILKVQIPSLKNQGLTIDG
NEU_2296 KNGTLIANAD**K**RYQNF**R**DYFNNNITQAIKF**[SYDNGRTW]**TNPREILKVQIPSLKNQGLTIDG
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

NEU_896 TMIEVE**Y**FENVSNKK**G**TKLFFFVDIFPDKTGLPHLHNGTIWTKI**NGKNYL****I**LYTRLKSND
NEU_2297 TMIEVV**Y**FENVSNKK**G**TKLFFFVDIFPDKTGLPHLHNGTIWTKI**TAQNYL****R**LYTRLKSND
NEU_105 TMIEVE**Y**FENVSNKK**G**TKLFFFVDIFPDKTGLPHLHNGTIWTKI**NGKNYL****R**LYTRLKSND
NEU_C142 TMIEVE**Y**FENVSNKK**G**TKLFFFVDIFPDKTGLPHLHNGTIWTKI**NGKNYL****R**LYTRLKSND
NEU_H831 TMIEVE**Y**FENVSNKK**G**TKLFFFVDIFPDKTGLPHLHNGTIWTKI**NGKNYL****R**LYTRLKSND
NEU_2296 TMIEVE**Y**FENVSNKK**G**TKLFFFVDIFPDKTGLPHLHNGTIWTKI**NGKNYL****R**LYTRLKSND
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

NEU_896 KFDDEISFLERV**Q**GT**H**NWFRRVIL**N**AGKDIKNATSSDFTLTS**D**Y**V**D**L**NY**H**TETSAITGIV
NEU_2297 RFDEDEISFLERV**H**G**T**HNWFRRVIL**N**AGKDIKNATSSDFTLTS**D**Y**V**D**L**NY**Q**TETSAITGIV
NEU_105 KFDDEISFLERV**Q**GT**H**NWFRRVIL**N**AGKDIKNATSSDFTLTS**D**Y**V**D**L**NY**H**TETSAITGIV
NEU_C142 KFDDEISFLERVG**T**QNWFRRVIL**K**TG**D**IKNATSSDFTLTS**D**Y**V**D**L**NY**H**TETSAITGIV
NEU_H831 KFDDEISFLERVG**T**QNWFRRVIL**K**AGKDIKNATSSDFTLTS**D**Y**V**D**L**NY**H**TETSAITGIV
NEU_2296 KFDDEISFLERVG**T**QNWFRRVIL**K**AGKDIKNATSSDFTLTS**D**Y**V**D**L**NY**H**TETSAITGIV
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

NEU_896 YKNI**Q**SESELNNPEVLQS**K**KTYSVLDFAYNN**T**SKY**D**LS**N**DEY**D**KL**K**NN**K**TG**K**LL**P**FN
NEU_2297 YKNI**Q**SESELNNPEVLQS**K**KTYSVLDFAY**S**IK**S**KY**V**LS**N**DEY**D**KV**K**D**N**I**K**TG**K**LL**A**FN
NEU_105 YKNI**Q**SESELNNPEVLQS**K**KTYSVLDF**A**NN**N**K**S**KY**D**LS**S**DEY**D**E**V**K**N**KK**K**TG**K**LL**A**FN
NEU_C142 YKNI**E**SESELNNPEVLQS**K**KTYSVLDF**A**NN**N**K**S**KY**V**LS**S**DEY**D**E**V**K**N**KK**K**TG**K**LL**A**FN
NEU_H831 YKNI**Q**SESELNNPEVLQS**K**KTYSVLDF**A**NN**N**K**S**KY**V**LS**S**DEY**D**E**V**K**N**KK**K**TG**K**LL**A**FN
NEU_2296 YKNI**Q**SESELNNPEVLQS**K**KTYSVLDF**A**NN**N**K**S**KY**V**LS**S**DEY**D**E**V**K**N**KK**K**TG**K**LL**A**FN
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

NEU_896 NHVVSIE**S**Y**H**NG**K**T**W**K**N**Q**I**W**I**D**E**D**V**Y**E**SS**K**NA**F**SG**T**AV**G**N**P****I****Q**LKHQKD**P**KLN**G**R**I**LLP
NEU_2297 NHVVSIE**S**Y**D**NG**K**T**W**E**N**Q**I**W**I**D**E**D**V**Y**E**SS**K**NA**F**SG**T**AV**G**N**P****I****Q**LKHQKD**P**KLN**G**R**I**LLP
NEU_105 NHVVSIE**S**Y**D**NG**K**T**W**K**N**L**R**W**I**D**E**D**V**Y**E**SS**K**NA**F**SG**T**AV**G**N**P****I****Q**LKHQKD**P**KLN**G**R**I**LLP
NEU_C142 NHVVSIE**S**Y**D**NG**K**T**W**K**N**L**R**W**I**D**E**D**V**Y**E**SS**K**NA**F**SG**T**AV**G**X**Q****F****I**LKHQKD**P**KLN**G**R**I**LLP
NEU_H831 NHVVSIE**S**Y**D**NG**K**T**W**K**N**L**R**W**I**D**E**D**V**Y**E**SS**K**NA**F**SG**T**AV**G**N**P****I****Q**LKHQKD**P**KLN**G**R**I**LLP
NEU_2296 NHVVSIE**I****T****H**D**G**T**W**K**N**L**R**W**I**D**E**D**V**Y**E**SS**K**NA**F**SG**T**AV**G**N**P****I****Q**LKHQKD**P**KLN**G**R**I**LLP
*****:*****:*****:*****:*****:

NEU_896 MY**Q**I**GGGG****I**PA**YY**LY**S**DDY**G**NS**W**K**R**Q**N**V**S**P**R**NL**T**ESS**M**IE**A**K**D**G**S**I**Y**W**L**L**R**ND**R**FG**G****A**
NEU_2297 MY**Q**K**GGGG****I**PA**YY**LY**S**DDY**G**NS**W**K**R**Q**N**V**S**P**R**NL**T**ESS**M**IE**A**K**D**G**S**I**Y**W**L**L**R**ND**R**FG**G****A**
NEU_105 MY**Q**I**GGGG****I**PA**YY**LY**S**DDY**G**NS**W**K**R**Q**N**V**S**P**R**NL**T**ESS**M**IE**A**K**D**G**S**I**Y**W**L**L**R**ND**R**FG**G****A**
NEU_C142 MY**Q**I**GGGG****I**PA**YY**LY**S**DDY**G**NS**W**K**R**Q**N**V**S**P**R**NL**T**ESS**M**IE**A**K**D**G**S**I**Y**W**L**L**R**ND**R**FG**G****A**
NEU_H831 MY**Q**I**GGGG****I**PA**YY**LY**S**DDY**G**NS**W**K**R**Q**N**V**S**P**R**NL**T**ESS**M**IE**A**K**D**G**S**I**Y**W**L**L**R**ND**R**FG**G****A**
NEU_2296 MY**Q**I**GGGG****I**PA**YY**LY**S**DDY**G**NS**W**K**R**Q**N**V**S**P**R**NL**T**ESS**M**IE**A**K**D**G**S**I**Y**W**L**L**R**ND**R**FG**G****A**
*****:*****:*****:*****:

NEU_896 TAKHWIT**K**S**V**D**GG**K**T****W****I**N**P**N**G**D**T**G**S**NG**K**D**L**N**I**G**N**K**N****F**D**G**N**V**F**S**G**I**G**Y**F**N**L**K**G**K**D**Y**F**I****S**
NEU_2297 TAKHWIT**K**S**V**D**GG**K**T****W****I**N**P**N**G**D**T**G**S**NG**K**D**L**N**I**G**N**K**N****F**D**G**N**V**F**S**G**I**G**Y**F**N**L**K**G**K**D**Y**F**I****S**
NEU_105 TAKHWIT**K**S**V**D**GG**K**T****W****I**N**P**N**G**D**T**G**S**NG**K**D**L**N**I**G**N**K**N****F**D**G**N**V**F**S**G**I**G**Y**F**N**L**K**G**K**D**Y**F**I****S**
NEU_C142 TAKHWIT**K**S**V**D**GG**K**T****W****I**N**P**N**G**D**T**G**S**NG**K**D**L**N**I**G**N**K**N****F**D**G**N**V**F**S**G**I**G**Y**F**N**L**K**G**K**D**Y**F**I****S**
NEU_H831 TAKHWIT**K**S**V**D**GG**K**T****W****I**N**P**N**G**D**T**G**S**NG**K**D**L**N**I**G**N**K**N****F**D**G**N**V**F**S**G**I**G**Y**F**N**L**K**G**K**D**Y**F**I****S**
NEU_2296 TAKHWIT**K**S**V**D**GG**K**T****W****I**N**P**N**G**D**T**G**S**NG**K**D**L**N**I**G**N**K**N****F**D**G**N**V**F**S**G**I**G**Y**F**N**L**K**G**K**D**Y**F**I****S**
*****:*****:*****:*****:

se nadaljuje

nadaljevanje priloge E: Poravnava aminokislinskega zaporedja nevraminidaz različnih sevov *M. cynos*.

NEU_896	AKDNIRRN <ins>G</ins> L <ins>F</ins> ITDSTFNDA <ins>T</ins> E <ins>F</ins> DYDFMLNQGN <ins>K</ins> KNEHFVSYALTIDE <ins>E</ins> EKDYVDILS
NEU_2297	AKDNIRRN <ins>G</ins> L <ins>F</ins> ITDSTFNDA <ins>T</ins> E <ins>F</ins> DYDFMLNQGN <ins>K</ins> KNEHFVSYALTIDE <ins>E</ins> EKDYVDILS
NEU_105	AKDNIRRN <ins>G</ins> L <ins>F</ins> ITDSTFNDA <ins>T</ins> E <ins>F</ins> DYDFMLNQGN <ins>K</ins> KNEHFVSYALTIDE <ins>E</ins> EKDYVDILS
NEU_C142	AKDNIRRN <ins>G</ins> L <ins>F</ins> ITDSTFNDA <ins>T</ins> E <ins>F</ins> DYDFMLNQGN <ins>K</ins> KNEHFVSYALTIDE <ins>E</ins> EKDYVDILS
NEU_H831	AKDNIRRN <ins>G</ins> L <ins>F</ins> ITDSTFNDA <ins>T</ins> E <ins>F</ins> DYDFMLNQGN <ins>K</ins> KNEHFVSYALTIDE <ins>E</ins> EKDYVDILS
NEU_2296	AKDNIRRN <ins>G</ins> L <ins>F</ins> ITDSTFNDA <ins>T</ins> E <ins>F</ins> DYDFMLNQGS <ins>K</ins> KNEHFVSYALTIDE <ins>D</ins> EKDYVDILS
	***** . ***** : ***** ; *****
NEU_896	YEASEKTRVHGKPN <ins>G</ins> DGL <ins>P</ins> EW <ins>E</ins> KRRPQA <ins>D</ins> EIQVDRFR <ins>I</ins> WLKDQK
NEU_2297	YEASEKTRVHGKPN <ins>G</ins> DGL <ins>P</ins> EW <ins>E</ins> KRRPQA <ins>D</ins> EIQVDRFR <ins>I</ins> WLKDQK
NEU_105	YEASEKTRVHGKPN <ins>G</ins> DGL <ins>P</ins> EW <ins>E</ins> KRRPQA <ins>D</ins> EIQVDRFR <ins>I</ins> WLKDQK
NEU_C142	YEASEKTRVHGKPN <ins>G</ins> DGL <ins>P</ins> EW <ins>E</ins> KRRPQA <ins>D</ins> EIQVDRFR <ins>I</ins> WLKDQK
NEU_H831	YEASEKTRVHGKPN <ins>G</ins> DGL <ins>P</ins> EW <ins>E</ins> KRRPQA <ins>D</ins> EIQVDRFR <ins>I</ins> WLKDQK
NEU_2296	YEASEKTRVRGDSHGKG <ins>G</ins> L <ins>P</ins> EW <ins>E</ins> KRRPQA <ins>D</ins> EIQVDRFR <ins>I</ins> WLKDQK
	***** : * . * . * : ***** ; *****

Legenda: Z rumeno so v poravnavi označene zamenjave aminokislin, z zeleno pa mesto, kjer pri sevu C142 manjka ena aminokislina (glutamin). Okvirji označujejo lokacijo štirih motivov Asp škatev in en RIP motiv.

Priloga F

Rezultati določanja aminokislinskega zaporedja HacA z masno spektrometrijo, prikaz
določenih peptidov na zaporedju proteina *M. canis* UF G1.

1 MSEKKRNIKS KVMLASGLAL LTGSIVATGV ILSQVNSKKK DDEPKTGNEP
51 K**FEPVVKLTD SK**DELNFEI SNLNATQNKG KEFIVVLTNK RDFAIRNEKS
101 ITIDSDSTNI KFDLSEDRQ YNLSILFKGK IVLKDVFDTK KRPAISAGTP
151 SATNASFVIS NINDFKDDLD KIQIVIK**NKT NPNSEPIIIK ASDLKV**SNGL
201 IVFNLENENL GLEPGQTYEA NVQLNDDKEK TNLSTPIVIE TPAPKNIAYT
251 SHISKEGVKI ALYGLKEDGK KIKLEYRLRG FNGDHTKVES IDNVTGGKAE
301 VLISGDLGFD NTYEFQVKYE DGEYLTFEDE SKKGEGFKTEA APSFEVQNN
351 DSNLNSISK**L SPNINQDNLF IRYRDKENSN EWIEKPIKEV PGFSEGKLN**L
401 EDLASDTNYE AQOLIYKQGEG ENASTK**ILTE AEFR**TSKYFV FDITKSIAAS
451 TKVLLSFKDN SNSTSSDLGV TLKYVKDGEA DLKTATLSK**K SLSSSNVQS**
501 **VISDLEK**STT YNWT LTSNKD NSVIASGTFK TGTDVDVAKS ADNSNFYETN
551 ESDVVAIENR LTEGVVVSVK NTFGYVTGDG VEKYSPTIEL IKYYPKDSES
601 EYETERIVVS SQDIKNKKFF TKKFEDFAET PYIFEVSYLN GFNENNEEIK
651 VLKKFEISYK LPVIEFKNNE KKLVVSNLES VIGK**TVTLKY K**ANDEAELT
701 ASGVVSQNGL LEITLSNLRA NKGYSGK**FEI ASNDVEFRNS ITNLTRSKFY**
751 ENDNDNDKLL LEYDFQTEEQ TNVIRIKHER SNHITTNTDI YVILEGFNMEN
801 ANEQVTFVVG TSEEMDNPSS IPAERKFTGT INESGVLDSS QDQWKRNLSS
851 GKNYKIAVFK VEDTNWTKIA ERDYLTPIVQ KAKVQKLEV GSNTNNPGFR
901 IPDCQAIKDL IEGNDDIIFR AQKITDDKPY IFGEGDVTLT QLPSRTDSL
951 RHLLFTRKYS KNELGKQGDV IRIKDWTGGS PLNRSWFNDK SKYQIILSIV
1001 RDGGDYVIAS ISEDDLIFIN HSSPQFVESE TKNVLKLKD NNKEFVGKLE
1051 FHNNNLWQYV STAENPQNLR AFYIKSNPDL SSSNPLNWIS AGNVVVTDEN
1101 QTGMIALDNL ETDTLYNLAFL DNDNNIILS KERVRTANKP KFKITTSGDT
1151 IMRYTSELK GSQNLVSNNGS YKIVYSADNS YNLSNNMITI DENTHLESFE
1201 GNVFVTLSEG LTPNTTYNYK LVNVTTNEVL LGYDDIFKTN **KSQSEETVIG**
1251 **NDFAVIKLIN PSYELREGSY SIAKKQGED EDKMLVDVIR** MQYSEDNSNFT
1301 EGQYKEFSVS LSENEANLLS IKLQDLKPGT QYYRLVKGA IKSNIIKNQS
1351 TEAEPVVELN IDSPLLGSF TTWNQQFKVE STTNSSRIIF ENIKDITGPN
1401 QLSLNFKKVD KSNIYDILFD YSIVDGKVF EVNNLSPETE YEFSLSPAGS
1451 QYKIANGKFS TKTASTIEAR MIKIDEPHR **IKLTNLEDIV GRKIRIEYKE**
1501 KNSTKILESI DTWLTENENDE FLWDIEDLEF K**EYKYDVYL LNEDNSVORI**
1551 IDTKEFEVGA KYTSGGDQQV TTNVRTFGNY DLNTWYTAT LQELEYANHKN
1601 WKEVKNSLY EVAIFGTQVS AGPAYGWHKL ISEGSDHRYY KDEKDSLVYE
1651 YIFIDPANQA TGAKAKVKGK FKFQLLGNTL QVKILEAKVK PEIVDGRVPI
1701 SGYSWVDLTE KLDYGATSGI VNQGNQDIPG RYINISGFKE KASTKKRSSR
1751 **DFTSPQIFR** NLESAKIATN NLTTSLHNET TGSFIKLSN KQKLKYGELE
1801 NNYDVAYNAY ISKDNKLLPF TGNFLINSSI YPSFAKGEK**N LYTPGFEYNK**
1851 **DLK**ANFFRML KENGKIRFDG SDVSNKGWIA FNSDDIIMFD DEINAYSEKY
1901 LVEFFFAKRL IWKIGNQLKG LRITMSDAAN GHGAILGVLD DFVYYLDLK
1951 NLNTKLLTWE QFISLSSKHS VHVKYMNENSN GTAIAGISFT TKDRSFIANN
2001 NSSTFTNPQN LQPVTEIDS SSEEETTRKI KLINAPLGNY EIKIEYPIYF
2051 PTLEQSDFQP IIERFEITSE DSSYFEKDTI NHLRHNTYEK VTLSRNGQIY
2101 QILNGFNSES NDGTFAFATN NAHPNFKLRP MGIYDNPTRN VPNDHNPLGS
2151 NNPQYGDAPG L