

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Marko BAJC

**ODKRIVANJE DOSLEJ ŠE NEOPISANIH
BAKTERIJ IZ REDA *CHLAMYDIALES* V
NEVRETEŇČARSKIH GOSTITELJIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Marko BAJC

**ODKRIVANJE DOSLEJ ŠE NEOPISANIH BAKTERIJ IZ REDA
CHLAMYDIALES V NEVRETEČARSKIH GOSTITELJIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DISCOVERING NEW BACTERIAL MEMBERS OF THE ORDER
CHLAMYDIALES IN INVERTEBRATE HOSTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo predstavlja zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno na Biotehniški fakulteti na Oddelku za zootehniko v Domžalah na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo ter Oddelku za biologijo v Ljubljani na Katedri za zoologijo.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je dne 5. julija 2006 za mentorja imenovala prof. dr. Gorazda Avguština in za somentorja doc. dr. Roka Kostanjška. Za recenzenta je bil imenovan prof. dr. Franc Viktor Nekrep.

Mentor: prof. dr. Gorazd Avguštin

Somentor: doc. dr. Rok Kostanjšek

Recenzent: prof. dr. Franc Viktor Nekrep

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines Mandič – Mulec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Gorazd Avguštin
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Rok Kostanjšek
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Franc Viktor Nekrep
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 24. november 2006

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Marko Bajc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.25:577.2.08:595(043)=863
KG	klamidije/ <i>Chlamydiales</i> /nevretenčarsi gostitelji/geni za 16S rRNK/verižna reakcija s polimerazo/kloniranje/sekvenciranje/sekvenčna analiza
AV	BAJC, Marko
SA	AVGUŠTIN, Gorazd (mentor), KOSTANJŠEK, Rok (somentor)/NEKREP, Franc Viktor (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2006
IN	ODKRIVANJE DOSLEJ ŠE NEOPISANIH BAKTERIJ IZ REDA <i>CHLAMYDIALES</i> V NEVRETEŃČARSKIH GOSTITELJIH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 61 str., 12 pregl., 13 sl., 21 pril., 45 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Bakterije iz reda <i>Chlamydiales</i> so obligatni endosimbionti evkariontskih gostiteljev. Izsledki različnih raziskav nakazujejo, da klamidije okužujejo tudi nevretenčarje. V tem delu smo poskusili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in z za klamidije specifičnimi začetnimi oligonukleotidi pomnožiti dele klamidijskih genov za 16S rRNK iz vzorcev nukleinskih kislin, osamljenih iz enajstih različnih nevretenčarov. Pomnožitev daljših odsekov klamidijskih genov za 16S rRNK ni uspela, saj je, ne glede na uporabljeni par začetnih oligonukleotidov, nastalo tudi večje število nespecifičnih pomnožkov ali pa pomnoževanje sploh ni uspelo. Zato smo uporabili začetna oligonukleotida Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst, s katerima smo uspešno pomnožili približno 260 bp dolg del bakterijskih genov za 16S rRNK, ki delno vključuje tudi za klamidije najbolj variabilno regijo, pri 9 od 11 preučevanih vzorcih. PCR pomnožke smo klonirali, iz izbranih klonov izolirali plazmidno DNK in izvršili restrikcijsko analizo s <i>PstI</i> . Izbrali smo 20 različnih klonov in plazmide z vključki sekvencirali. Sekvenčna analiza sedmih uspešno sekvenciranih klonov je razkrila, da je 5 sekvenc klamidijskih in da so po podobnosti najbližje sekvenci gena za 16S rRNK bakterije ' <i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> '. Preostali sekvenci najverjetneje nista klamidijski, saj sta jima najpodobnejši sekvenci genov za 16S rRNK bakterije <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> Bu 43 in negojenega bakterijskega klena 29c-d9, katerega sekvencia gena za 16S rRNK je najpodobnejša bakterijam iz rodu <i>Ruminococcus</i> . Dokazali smo prisotnost klamidijskih sekvenc genov za 16S rRNK v štirih nevretenčarjih (pajek <i>Dysdera ninni</i> , enakonožec <i>Asellus aquaticus</i> ter stonogi <i>Julus sp.</i> in <i>Polydesmus sp.</i>), v katerih doslej klamidijski endosimbionti niso bili opisani. Predvidevamo, da so uporabljeni PCR protokoli in začetni oligonukleotidi najverjetneje suboptimalni za pomnoževanje zgolj klamidijskih sekvenc genov za 16S rRNK. Za natančnejšo filogenetsko analizo bi morali uspešno pomnožiti daljše odseke (vsaj 1000 bp) genov za 16S rRNK. Kljub kratkim dolžinam pomnožkov genov za 16S rRNK rezultati naše raziskave nakazujejo precejšnjo genetsko pestrost klamidij sorodnih ' <i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> ' pri nevretenčarjih in podpirajo domnevo, da so nevretenčarji pomemben naravni rezervoar klamidijskih endosimbiontov.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.25:577.2.08:595(043)=863
CX chlamydiae/*Chlamydiales*/invertebrate hosts/16S rRNA genes/polymerase chain reaction (PCR)/molecular cloning/sequencing/sequence analysis
AU BAJC, Marko
AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor), KOSTANJŠEK, Rok (co-advisor)/NEKREP, Franc Viktor (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2006
TI DISCOVERING NEW BACTERIAL MEMBERS OF THE ORDER *CHLAMYDIALES* IN INVERTEBRATE HOSTS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIV, 61 p., 12 tab., 13 fig., 21 ann., 45 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Bacteria belonging to the order *Chlamydiales* are obligate endosymbionts of eukaryotic hosts. Findings presented by different research groups indicate that chlamydiae also infect invertebrates. In this work we attempted to amplify parts of chlamydial 16S rRNA genes using PCR with chlamydiae-specific primers in DNA samples from eleven different invertebrates. Attempts to amplify longer segments of chlamydial 16S rRNA genes were unsuccessful, as PCR with different sets of forward and reverse primers also yielded several unspecific products or no products at all. Best results were obtained with primers Chl_16S(270)fpst and Chl_16S(530)rpst. PCR with this set of primers yielded the expected 260 bp long products, which partially included the signature region for chlamydiae, from 9 out of 11 studied samples. PCR products were cloned and plasmid DNA was isolated from selected cultures. Restriction analysis of isolated plasmid DNA was performed with *PstI* restriction endonuclease. 20 clones were sequenced. Sequence analyses of seven successfully sequenced clones revealed that 5 sequences were of chlamydial origin showing the highest degree of similarity to 16S rRNA gene sequence of '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'. The remaining two sequences were most likely not chlamydial, as they exhibited highest degree of similarity to 16S rRNA gene sequences of *Butyrivibrio fibrisolvens* Bu 43 and uncultured bacterium clone 29c-d9, which is, according to 16S rRNA gene sequence similarity, most similar to bacteria of the genus *Ruminococcus*. We have certainly proven the presence of chlamydial 16S rRNA gene sequences in DNA samples from four different invertebrates, in which chlamydiae had not been described previously, namely arachnid *Dysdera ninnii*, isopod crustacean *Asellus aquaticus* and millipedes *Julus sp.* and *Polydesmus sp.* We assume that PCR protocols and primers, used in this work, are suboptimal for specific amplification of target 16S rRNA gene sequences. To obtain more representative and phylogenetically reliable results, it would be necessary to amplify at least 1000 bp long sections of 16S rRNA gene sequences. Results of our research suggest, despite relative shortness of analysed segments of 16S rRNA genes, that high genetic diversity exists among chlamydiae related to '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' in invertebrate hosts and support proposals that invertebrates are an important natural pool of chlamydiae.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key word documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	XI
Okrajšave in simboli	XIV
1 UVOD	1
1.1 Hipoteze in namen dela	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 <i>Chlamydiae</i>	2
2.1.1 Filogenija in raznolikost reda <i>Chlamydiales</i>	4
2.1.2 Klamidijski endosimbionti v nevretenčarjih	8
2.1.2.1 ' <i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> '	8
2.1.2.2 ' <i>Candidatus Rhabdochlamydia crassificans</i> '	10
2.1.2.3 ' <i>Candidatus Fritschea bemisiae</i> ' in ' <i>Candidatus Fritschea eriococci</i> '	11
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 MATERIAL	13
3.1.1 Vzorci	13
3.1.2 Kompleti	14
3.1.3 Raztopine in pufri	14
3.1.4 Sevi	15
3.1.6 Gojišča	15
3.2 METODE	16
3.2.1 Sekcija enakonožnih rakov <i>Porcellio scaber</i> in odvzem okuženih žlez hepatopankreasa	16

3.2.2	Izolacija skupne mikrobne DNK	17
3.2.3	Pomnoževanje bakterijskih genov za 16S rRNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)	18
3.2.4	Agarozna gelska elektroforeza	20
3.2.5	Osamitev PCR pomnožkov iz agaroznega gela	21
3.2.6	Kloniranje	21
3.2.6.1	Priprava kompetentnih celic	21
3.2.6.2	Namnoževanje in izolacija plazmida pUC18	22
3.2.6.3	Restrikcija in ligacija plazmida pUC18 in PCR pomnožkov	23
3.2.6.4	Izolacija plazmidne DNK	24
3.2.7	Sekvenciranje in sekvenčna analiza	25
4	REZULTATI	26
4.1	Specifičnost uporabljenih začetnih oligonukleotidov	26
4.2	Pomnoževanje klamidijskih 16S rRNK genov v verižni reakciji s polimerazo (PCR)	27
4.2.1	Modifikacija izbranega PCR protokola in začetnih oligonukleotidov za kloniranje	29
4.3	Kloniranje klamidijskih pomnožkov	31
4.3.1	Restrikcijska analiza izolirane plazmidne DNK	34
4.4	Sekvenciranje in analiza sekvenc	36
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	40
5.1	RAZPRAVA	40
5.1.1	Nevretenčarski gostitelji	40
5.1.2	Pomnoževanje delov klamidijskih 16S rRNK genov z verižno reakcijo s polimerazo	40
5.1.3	Kloniranje in analiza klonov	43
5.1.4	Sekvenciranje in analiza sekvenc	45
5.2	SKLEPI	50
6	POVZETEK	52

6.1	SUMMARY	54
------------	----------------	-----------

7	VIRI	56
----------	-------------	-----------

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Taksonomija reda <i>Chlamydiales</i> (Corsaro in sod., 2003)	5
Preglednica 2: Seznam nevretenčarjev, iz katerih izolirano skupno DNA smo uporabili v našem delu	13
Preglednica 3: Seznam in značilnosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov	19
Preglednica 4: Osnovni PCR protokoli	20
Preglednica 5: Sestava restrikcijskih mešanic	23
Preglednica 6: Rezultati <i>in silico</i> analize specifičnosti začetnih oligonukleotidov	26
Preglednica 7: Uspešnost pomnoževanja klamidijskih genov za 16S rRNK	29
Preglednica 8: Optimiziran PCR protokol 1	30
Preglednica 9: Pogostost tarčne sekvence za <i>PstI</i> znotraj bakterijskih debel z največ zadetki	33
Preglednica 10: Sekvence delov genov za 16S rRNK v FASTA obliki	37
Preglednica 11: Seznam najpodobnejših sekvenc v bazah podatkov, pridobljenih z BlastN	38
Preglednica 12: Seznam najpodobnejših sekvenc v bazah podatkov, pridobljenih s Fasta3	39

KAZALO SLIK

Slika 1: Razvojni krog bakterij reda <i>Chlamydiales</i>	3
Slika 2: 'Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis' (Kostanjšek in sod., 2004: 545)	9
Slika 3: 'Candidatus Rhabdochlamydia crassificans' (Corsaro in sod., 2006: 2)	10
Slika 4: Presevna elektronska mikrografija vsebine bakteriocite v enakokrilcu <i>B. tabaci</i> (Everett in sod., 2005: 1582)	12
Slika 5: <i>Porcellio scaber</i>	17
Slika 6: Na 1% agarozni gel nanešeni s PCR pomnoženi deli genov za 16S rRNK vseh vzorcev s klamidijskima začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)f in Chl_16S(530)r	27
Slika 7: Na 1% agarozni gel nanešeni s PCR s klamidijskima začetnima oligonukleotidoma Chla-2-18-f in Chl_16S(1300)r pomnoženi deli genov za 16S rRNK vseh vzorcev	28
Slika 8: Na 1,5% agarozni gel nanešeni s PCR s klamidijskima začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst pomnoženi deli genov za 16S rRNK vseh uspešno pomnoženih vzorcev	31
Slika 9: Na 1,5% agarozni gel nanešeni očiščeni, s klamidijskima začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst pomnoženi deli genov za 16S rRNK vseh uspešno pomnoženih vzorcev	32
Slika 10: A) Na 1,5% agarozni gel nanešeni s PCR z začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst pomnoženi deli genov za 16S rRNK, ki smo jih rezali z restrikcijsko endonukleazo <i>PstI</i> . B) Na 1% agarozni gel nanešen izoliran plazmid pUC18 in pUC18, rezan z restrikcijsko endonukleazo <i>PstI</i>	32

- Slika 11:** **A)** Elektroforetska ločitev plazmidne DNK klonov iz vzorcev 5 in 17 v 1% agaroznem gelu. **B)** Elektroforetska ločitev s *PstI* rezane plazmidne DNK klonov iz vzorcev 5 in 17 v 1,5% agaroznem gelu 34
- Slika 12:** **A)** Elektroforetska ločitev plazmidne DNK klonov iz vzorcev 21 in 23 v 1% agaroznem gelu. **B)** Elektroforetska ločitev s *PstI* rezane plazmidne DNK klonov iz vzorcev 21 in 23 v 1,5% agaroznem gelu 35
- Slika 13:** **A)** Elektroforetska ločitev plazmidne DNK klonov iz vzorcev 14, 25 in 26 v 1% agaroznem gelu. **B)** Elektroforetska ločitev s *PstI* rezane plazmidne DNK klonov iz vzorcev 14, 25 in 26 v 1,5% agaroznem gelu 36

KAZALO PRILOG

Prilogi A: Poravnava sekvence K5C z najpodobnejšimi sekvencami, pridobljenimi s FASTA

Priloga A1: Poravnava sekvence K5C s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' CRIB01

Priloga A2: Poravnava sekvence K5C s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'

Prilogi B: Poravnava sekvence K5J z najpodobnejšimi sekvencami, pridobljenimi s FASTA

Priloga B1: Poravnava sekvence K5J s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'

Priloga B2: Poravnava sekvence K5J s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' CRIB01

Prilogi C: Poravnava sekvence K14J z najpodobnejšimi sekvencami, pridobljenimi s FASTA in BlastN

Priloga C1: Poravnava sekvence K14J s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije *Butyrivibrio fibrisolvens* Bu 43

Priloga C2: Poravnava sekvence K14J s sekvenco gena za 16S rRNK bakterijskega klena 29c-d9 iz debelega črevesa človeka

Prilogi D: Poravnava sekvence K17F z najpodobnejšimi sekvencami, pridobljenimi s FASTA

Priloga D1: Poravnava sekvence K17F s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'

Priloga D2: Poravnava sekvence K17F s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' CRIB01

Prilogi E: Poravnava sekvence K21D z najpodobnejšimi sekvencami, pridobljenimi s FASTA

Priloga E1: Poravnava sekvence K21D s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'

Priloga E2: Poravnava sekvence K21D s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' CRIB01

Prilogi F: Poravnava sekvence K23E z najpodobnejšimi sekvencami, pridobljenimi s FASTA

Priloga F1: Poravnava sekvence K23E s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'

Priloga F2: Poravnava sekvence K23E s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' CRIB01

Prilogi G: Poravnava sekvence K23K z najpodobnejšimi sekvencami, pridobljenimi s FASTA in BlastN

Priloga G1: Poravnava sekvence K23K s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije *Butyrivibrio fibrisolvens* Bu 43

Priloga G2: Poravnava sekvence K23K s sekvenco gena za 16S rRNK bakterijskega klona 29c-d9 iz debelega črevesa človeka

Priloga H: Poravnava klamidijskih sekvenc med seboj

Priloga H1: Poravnava sekvenc K5J in K17F

Priloga H2: Poravnava sekvenc K5J in K21D

Priloga H3: Poravnava sekvenc K5J in K23E

Priloga H4: Poravnava sekvenc K17F in K21D

Priloga H5: Poravnava sekvenc K17F in K23E

Priloga H6: Poravnava sekvenc K21D in K23E

Priloga I: Poravnavna sekvenc K14J in K23K

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BLAST	Basic Logical Alignment Search Tool (orodje za iskanje osnovnih logičnih poravnav nukleotidnih ali aminokislinskih zaporedij)
bp	bazni par
CTAB	heksadeciltrimetilamonijev bromid
dATP	2'-deoksiadenozin-5'-trifosfat
dCTP	2'-deoksicitidin-5'-trifosfat
dGTP	2'-deoxigvanozin-5'-trifosfat
dNTP	2'-deoksinukleozid-5'-trifosfat(i)
dTTP	2'-deoksitimidin-5'-trifosfat
EBI	European Bioinformatics Institute (Evropski inštitut za bioinformatiko)
EMBL	European Molecular Biology Laboratory (Evropski molekularno-biološki laboratorij)
IPTG	izopropil-β-D-galaktopiranozid
Mbp	milijon baznih parov
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Državni center za biotehnološke informacije)
nt	nukleotid
TRIS	2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diol
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid

1 UVOD

Bakterije iz reda *Chlamydiales* so že dolgo znani povzročitelji različnih bolezni pri živalih in ljudeh. Znanstveniki so na podlagi podatkov, pridobljenih s tradicionalnimi mikrobiološkimi metodami, dolgo časa domnevali, da to skupino bakterij sestavlja le nekaj dokaj sorodnih vrst. Razvoj in uporaba molekularnih metod v mikrobiologiji pa sta raziskovalcem omogočila mnogo celovitejši in širši vpogled v pestrost in razširjenost klamidij v okolju. Tako so v zadnjem desetletju številne raziskovalne skupine predstavile podatke, ki kažejo, da so sekvence, podobne klamidijskim ribosomskim sekvencam, prisotne v različnih vretenčarskih in nevretenčarskih živalskih gostiteljih, enoceličnih evkariontih in celo v vodi ter arktičnem ledu. Mnoge omenjene sekvence pripadajo doslej še neznanim predstavnikom reda *Chlamydiales*. Med omenjena odkritja sodi tudi opis in predlog poimenovanja klamidije ('*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*') iz hepatopankreasa kopenskega izopodnega raka *Porcellio scaber*. Kljub takšnim odkritjem lahko še vedno domnevamo, da za veliko večino klamidij dejanski krog gostiteljev, razširjenost in genetska pestrost še niso raziskani.

1.1 Hipoteze in namen dela

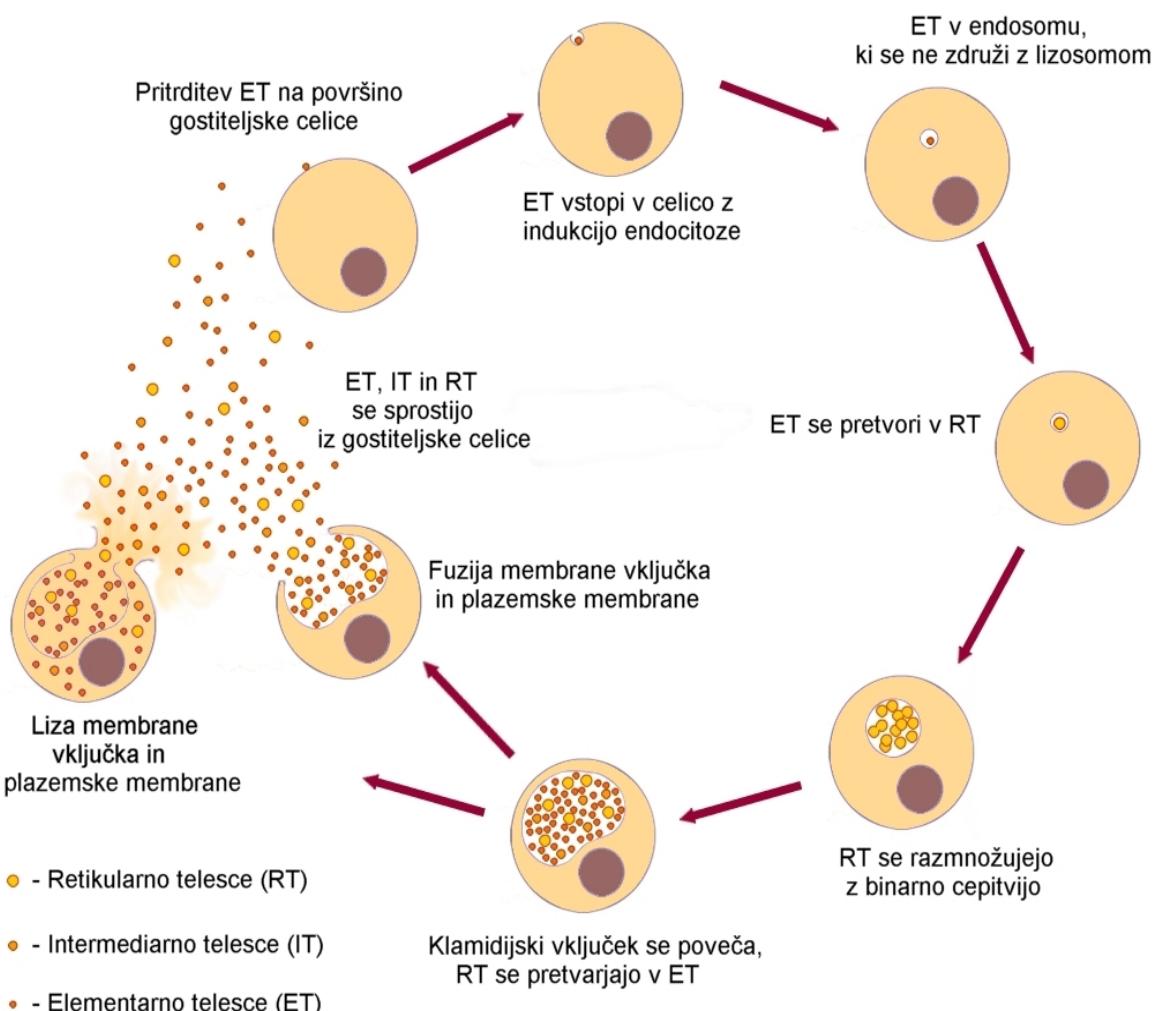
Nekateri nevretenčarji, zlasti členonožci, so dokazano gostitelji znotrajceličnih bakterij reda *Chlamydiales*. Predvidevamo, da je krog nevretenčarskih gostiteljev klamidij najverjetnejše mnogo širši. Prisotnost klamidij lahko potrdimo z verižno reakcijo s polimerazo s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi in sekvenčno analizo pridobljenih sekvenc 16S ribosomskih genov. Primerjalna sekvenčna analiza nam lahko omogoči tudi vpogled v genetsko pestrost tarčne bakterijske skupine, prisotne v prebavilih in drugih tkivih nevretenčarjev.

Namen tega diplomskega dela je iz vzorcev DNK, izolirane iz delov prebavnega trakta različnih živalskih nevretenčarskih gostiteljev, z verižno reakcijo s polimerazo s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi pomnožiti sekvence klamidij, jih klonirati, sekvencirati in s primerjalno sekvenčno analizo potrditi, da gre v primeru preučenih pomnožkov v resnici za dele klamidijskih genov v preiskovanih vzorcih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 *Chlamydiae*

Vsi doslej opisani predstavniki bakterijskega debla *Chlamydiae* so organotrofni obligatni znotrajcelični simbionti (mutualistični ali parazitski) evkariontskih gostiteljev. Običajno se barvajo po Gramu negativno, nekateri tudi variabilno (*Parachlamydiaceae*) in imajo za po Gramu negativne bakterije tipično zunanjo in notranjo membrano z variabilnim periplazemskim prostorom (Everett, 2000). Peptidoglikanskega sloja v celičnih ovojnicah klamidij ne zasledimo. Klamidije imajo značilen dvofazni razvojni življenjski cikel. Infektivna in metabolno neaktivna elementarna telesca, velika od 0,2 do 0,5 µm, se pritrди na površino gostiteljske celice in vstopijo vanjo z indukcijo endocitoze. Elementarna telesca vstopijo v citoplazmo gostiteljske celice v z membrano obdanih vakuolah (izjemo predstavlja *Neochlamydia hartmannellae*, ki živi prosto v citoplazmi amebnega gostitelja) in se pretvorijo v vegetativno obliko, tj. metabolno aktivna retikularna telesca, ki merijo 0,5 do 1,5 µm v premeru. Retikularna telesca se delijo z binarno cepitvijo in tvorijo intravakuolne mikrokolonije, t.i. klamidijske vključke. Klamidije z zaenkrat še neidentificiranim mehanizmom preprečijo fagolizosomsko fuzijo vakuole. Retikularna telesca se sčasoma pretvorijo v infektivna elementarna telesca, ki se sprostijo iz gostiteljske celice z lizo celične membrane ali fuzijo vakuole z gostiteljsko plazemsko membrano. Sproščena klamidijska elementarna telesca se razširjajo bodisi aerosolno bodisi z neposrednim stikom z gostiteljem. Celoten cikel je zaključen v 36 do 96 urah, odvisno od vrste. Posebnost predstavlja *Simkania negevensis*, katere razvojni cikel traja dva tedna z neobičajno stacionarno fazo. Poleg tega retikularna telesca *S. negevensis* ohranijo infektivno sposobnost in so mnogo odpornejša na toplotni in osmotski stres kot vegetativna oblika ostalih klamidij (Corsaro in sod., 2003; Everett in sod., 1999).



Slika 1: Razvojni krog bakterij reda *Chlamydiales*

Zaradi prilagoditve na znotrajcelični način življenja so klamidije tekom evolucije izgubile številne gene, potrebne za prosto življenje, kar je vodilo v zmanjševanje velikosti genoma. Klamidije imajo tako močno okrnjene biosintetske poti in centralni metabolizem ter so avksotrofne za večino aminokislin in tudi nukleotide. Vse bakterije reda *Chlamydiales* izkoriščajo zalogo ATP iz citosola gostiteljske celice. To jim omogoča ATP/ADP translokaza, ki vrši vnos ATP v endosimbiontsko celico in iznos ADP iz celice. Specializirani transportni proteini jim omogočajo vnos nukleotidov, aminokislin in oligopeptidov iz citosola gostiteljske celice. Klamidije, katerih naravnii gostitelji so vretenčarji, imajo splošno bolj reducirani genom (velikost genoma za družino *Chlamydaceae* je med 1 in 1,2 Mbp), saj predstavljajo vretenčarske celice bolj homeostatično nišo kot pa npr. celice protistov. Genom 'okoljske klamidije', endosimbionta

ameb rodu *Acanthamoeba* UWE25 (družina *Parachlamydiaceae*), tako obsega kar 2,4 Mbp in vključuje vse gene Krebsovega cikla in dodatne komponente dihalne verige v primerjavi z genomi predstavnikov družine *Chlamydiaceae*. Manjša izguba genov tekom evolucije omogoča 'okoljskim klamidijam' boljšo prilagodljivost na spremembe okoljskih razmer (Horn in sod., 2004).

2.1.1 Filogenija in raznolikost reda *Chlamydiales*

V red *Chlamydiales* (edini red v deblu *Chlamydiae*) uvrščamo obligatno znotrajcelične bakterije z značilnim dvofaznim življenjskim ciklom in vsaj 80-odstotno podobnostjo sekvenc genov za 16S rRNK in/ali 23S rRNK s klamidijskimi. Do nedavnega je red predstavljal zgolj družina *Chlamydiaceae* z rodom *Chlamydia* s štirimi vrstami, ki so bile odkrite in opisane v vretenčarskih gostiteljih. Razvoj molekularno-bioloških metod in kriterija uvrščanja organizmov na podlagi analiz DNK v 80-ih letih ter njihova množičnejša uporaba v 90-ih letih dvajsetega stoletja (Amann in sod., 1995; Grayston in sod., 1989; Fukushi in Hirai, 1992; Everett in Anderson, 1997; Pudjiatmoko in sod., 1997; Kaltenboeck in sod., 1993; Takashi in sod., 1997) so razkrili večjo pestrost in obstoj drugih vrst v družini *Chlamydiaceae*. Poleg tega so raziskave odkrile dodatne skupine klamidijam podobnih organizmov, ki so po kriteriju podobnosti sekvenc genov za 16S rRNK sodili v red *Chlamydiales*, vendar so se razlikovali od predstavnikov družine *Chlamydiaceae* (Kahane in sod., 1995; Birtles in sod., 1997; Amann in sod., 1997). Ta dognanja so upravičila potrebo po novi ureditvi reda. Tako je red trenutno razdeljen na družine *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Simankiaceae* in *Waddliaceae*, ki vključujejo skupno šest rodov in trinajst vrst (Everett in sod., 1999).

Preglednica 1: Taksonomija reda *Chlamydiales* (Corsaro in sod., 2003)

Sistematička	Naravni gostitelj	Patogenost	Okužbe človeka
deblo B – XVI <i>Chlamydiae</i>, red <i>Chlamydiales</i>			
družina I. <i>Chlamydiaceae</i>			
rod I. <i>Chlamydia</i>			
<i>C. trachomatis</i>	človek	očesne, urogenitalne infekcije	++
<i>C. muridarum</i>	glodalci	respiratorne, očesne, urogenitalne infekcije	-
<i>C. suis</i>	svinje	enteritis	-
rod II. <i>Chlamydophila</i>			
<i>Chl. psittaci</i>	ptice	ptičja klamidioza	+
<i>Chl. abortus</i>	prežvekovalci	splav	+
<i>Chl. felis</i>	mačke	respiratorne, očesne infekcije	+
<i>Chl. caviae</i>	morski prašiček	konjuktivitis	-
<i>Chl. pecorum</i>	sesalci	enteritis, splav, poliartritis	-
<i>Chl. pneumoniae</i>	človek, konj, koala	respiratorne, očesne, urogenitalne infekcije	++
družina II. <i>Parachlamydiaceae</i>			
rod I. <i>Parachlamydia</i>			
<i>P. acanthamoebae</i>	<i>Acanthamoeba</i>	endosimbiont	? ++
rod II. <i>Neochlamydia</i>			
<i>N. hartmannellae</i>	<i>Hartmannella</i>	parazit	? -
družina III. <i>Simkaniaeae</i>			
rod I. <i>Simkania</i>			
<i>S. negevensis</i>	? človek	? respiratorne infekcije	? ++
družina IV. <i>Waddliaceae</i>			
rod I. <i>Waddlia</i>			
<i>W. chondrophila</i>	? govedo	? splav	-

- (?), slabo raziskano
- (++), človek je naravni gostitelj
- (+), lahko okužuje človeka
- (-), ni znanih okužb človeka

Dejanska pestrost klamidij in obsega njihovih gostiteljev je verjetno še mnogo večja, kar nakazujejo številna odkritja in opisi klamidijam podobnih organizmov v različnih gostiteljih. Tako so raziskovalci predstavili številne morfološke dokaze o obstoju znotrajceličnih simbiontov z značilnim klamidijskim dvofaznim razvojnim ciklom v ribah (Crespo in sod., 1999; Groff in sod., 1996), kameleonih (Jacobson in Telford, 1990), želvah (Homer in sod., 1994), školjkah (Fryer in Lannan, 1994), pajkih (Osaki, 1977), škorpijonih (Morel, 1976) in enakonožnih rakih (Shay in sod., 1985; Drobne in sod., 1999). Celovitejši vpogled v pestrost klamidij pa je omogočila šele uporaba ustreznih molekularnih tehnik, ki večinoma temeljijo na analizi sekvenc genov za 16S in 23S rRNK. Tako je danes znanih in v javnih bazah podatkov objavljenih nekaj sto sekvenc genov za rRNK, ki jih zaradi vsaj 80-odstotne podobnosti z zanimi klamidijskimi predstavniki uvrščamo v red *Chlamydiales* (Corsaro in sod., 2003).

Klamidije so že dolgo znani in pomembni patogeni človeka in veljajo za najpomembnejše povzročitelje spolno prenosljivih bolezni (*Chlamydia trachomatis*) in ozdravljive slepote (*C. trachomatis*) ter respiratornih infekcij (*Chlamydophila pneumoniae*) (Ossewaarde in Meijer, 1999). Na podlagi podatkov, pridobljenih z molekularnimi metodami, pa začenjamo klamidije obravnavati tudi kot 'novo porajajoče patogene ljudi in živali'. Tako sta uporaba klamidijskih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje sekvenc ribosomskih genov v verižni reakciji s polimerazo in analiza pridobljenih pomnožkov potrdili prisotnost in vpletene klamidij v najrazličnejša bolezenska stanja vretenčarjev, ki poleg respiratornih, očesnih in urogenitalnih infekcij vključujejo tudi aterosklerozo, Alzheimerjevo bolezen, multiplo sklerozo, endokarditis (*Chlamydophila pneumoniae*) in Kawasakiev sindrom (*Parachlamydia acathamoebiae*) pri ljudeh, pri živalih pa splave pri govedu (*Waddlia chondrophila*), sistemsko paraklamidiozo in klamidiozo pri plazilcih (*Parachlamydiaceae* in *Chlamydiaceae*) ter letalne sistemske infekcije pri žabah (*Chlamydophila pneumoniae*) (Corsaro in sod., 2003, 2004). Kot povzročitelja razjed škržnega epitela pri gojenem atlantskem lososu *Salmo salar* so prepoznali doslej še neopisano, klamidijam podobno bakterijo. Elektronska mikroskopija histoloških vzorcev okuženih škrge je razkrila prisotnost v vakuolah lokaliziranih bakterij z za klamidije značilnim dvofaznim razvojnim ciklom. S sekvenčno analizo v verižni reakciji s polimerazo pomnoženih genov za 16 rRNK so raziskovalci dokazali, da gre za novo vrsto

v redu *Chlamydiales*, ki predstavlja povsem samosvojo vejo znotraj reda in je filogenetsko ločena od vseh doslej znanih klamidij. Trenutno ima '*Candidatus Piscichlamydia salmonis*' status kandidatne vrste, saj še ni bila uspešno gojena v čisti kulturi (Draghi in sod., 2004). Kot patogeni vretenčarjev se pojavljajo tudi sevi klamidij, ki jih doslej nismo obravnavali kot nevarne (*Parachlamydiaceae*).

Razen v kliničnih vzorcih so z molekularnimi metodami odkrili prisotnost klamidijskih sekvenč tudi v okoljskih vzorcih. Ti so večinoma vezani na vodna okolja, kot so komunalne in odpadne vode (Horn in sod., 2000), aktivno blato v čistilnih napravah (Horn in Wagner, 2001), sladkovodni vzorci (Corsaro in sod., 2002), sediment antarktičnih jezer in morske kontinentalne police (Bowman in sod., 2000) in antarktični morski led (Brown in Bowman, 2001). Iz vzorca reke Sene so raziskovalci uspeli izolirati in v kokulturi z amebo *Acanthamoeba castellanii* gojiti še neopisano klamidijo z elementarnimi telesci neobičajne zvezdaste oblike, ki so jo poimenovali *Criblamydia sequanensis*. Analiza sekvenč genov za 16S rRNK, 23S rRNK, ADT/ATP translokazo in RnpB je pokazala, da se *C. sequanensis* uvršča v nov rod znotraj družine *Chlamydiaceae* (Thomas in sod., 2006). Odstopanje od vezanosti na vodna okolja morda predstavlja vzorec rizofsere, v katerem so tudi potrdili prisotnost klamidijskih sekvenč (Schmalenberger in Tebbe, 2002).

Pomemben naravni rezervoar klamidij verjetno predstavljajo enocelični evkarionti, zlasti amebe. Tudi pogostost klamidijskih sekvenč (zlasti *Parachlamydiaceae*) v vodnih okoljih je verjetno povezana z velikim številom prisotnih evkariontskih enoceličnih gostiteljev klamidij. Sama številčnost, vrstna pestrost in razširjenost enoceličnih evkariontov daje slutiti, da so potencialno gostitelji številnim še neopisanim predstavnikom reda *Chlamydiales* (Corsaro in sod., 2003). Pomemben vidik enoceličnih gostiteljev je tudi možnost gojenja klamidij v kulturi ameb. V amebah je mogoče aksenično gojiti tudi klamidije, katerih naravni gostitelji niso amebe. Tak primer je uspešna okužba in gojenje bakterije *Chlamydia pneumophila* v amebnem gostitelju *Acanthamoeba castellani* (Essig in sod., 1997) in gojenje *Simkania negevensis* v kulturi *Acanthamoeba polyphaga* (Kahane in sod., 2001). Aksenično gojenje klamidij v amebah raziskovalcem ponuja nove možnosti za celovitejše raziskave okoljskih klamidij. Poleg tega gojenje bakterij v enoceličnih evkariontskih gostiteljih zadovoljuje pogoj za opis novih bakterijskih vrst.

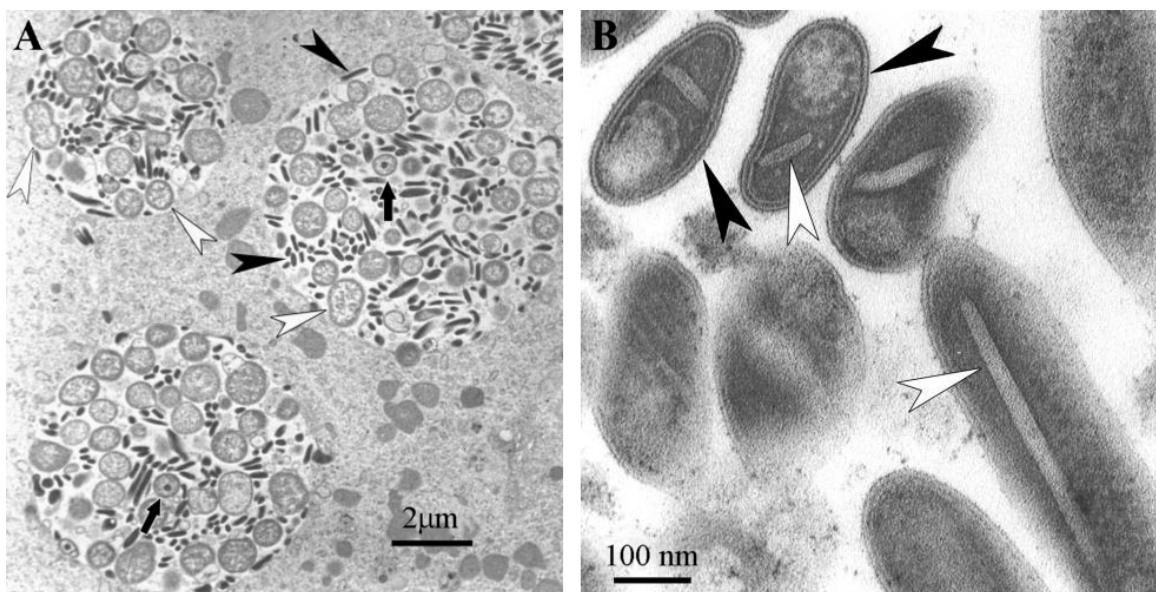
2.1.2 Klamidijski endosimbionti v nevretenčarjih

Kljud morfološkim dokazom o prisotnosti klamidijam podobnih endosimbiontov v nevretenčarjih so le-ti dolgo veljali za malo pomemben naravni rezervoar predstnikov reda *Chlamydiales*. Trenutno so opisani širje klamidijski endosimbionti nevretenčarjev, ki pa imajo zaradi nezmožnosti gojenja v čisti kulti status kandidatne vrste ('*Candidatus*'). Prvi sta '*Candidatus Fritschea bemesiae*' in '*Candidatus Fritschea eriococci*' (Thao in sod., 2003), ki okužujeta enakokrilca *Bemisia tabaci* in *Eriococcus spurius*. Druga vrsta, '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*', je bila prepoznana kot povzročitelj okužb hepatopankreasa pri kopenskih enakonožnih rakih vrste *Porcellio scaber* (Kostanjšek in sod., 2004). Kot zadnja je bila opisana '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' (Corsaro in sod., 2006), ki so jo odkrili v ščurku *Blatta orientalis*. '*Candidatus F. bemesiae*' in '*Candidatus F. eriococci*' uvrščamo v družino *Simkaniaceae*, '*Candidatus R. porcellionis*' in '*Candidatus R. crassificans*' pa tvorita svojo vejo znotraj reda *Chlamydiales*, ki je najbližje družini *Simkaniaceae*, vendar filogenetsko ločena od nje. Po kriterijih za določanje bakterijskih taksonov pa predstavnika kandidatnega rodu *Rhabdochlamydia* tvorita novo družino znotraj reda *Chlamydiales*. Odkritje klamidijskih endosimbiontov pri členonožcih, izredna raznolikost, številčnost in razširjenost členonožcev ob upoštevanju koevolucije bakterijskih endosimbiontov in njihovih gostiteljev nakazujejo, da so členonožci v resnici potencialno velik in izredno pomemben naravni rezervoar klamidij.

2.1.2.1 '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'

'*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' povzroča okužbe notranjih organov, predvsem hepatopankreasa, pri kopenskem enakonožnem raku *Porcellio scaber*. Okužba je vidna kot izrazite bele lise v hepatopankreasu, ki so posledica velike gostote znotrajceličnih klamidijskih kolonij. V celicah okuženih žlez so opazni trije tipi celic bakterijskih endosimbiontov: kroglasta retikularna in intermediarna telesca (zgodnja razvojna faza elementarnih teles) ter paličasta elementarna telesca. Retikularna telesca imajo trislojno celično steno in se pojavljajo v dveh oblikah: manjša, velika do 1 µm v premeru, in kot večja velika 1 do 4 µm. Za zrela elementarna telesca je značilna petslojna celična stena in

paličasta oblika, po kateri so bakterijo tudi poimenovali. Merijo 250 do 700 nm v dolžino in 100 do 150 nm v premeru. Intermediarna telesca merijo 350 do 650 nm v premeru.

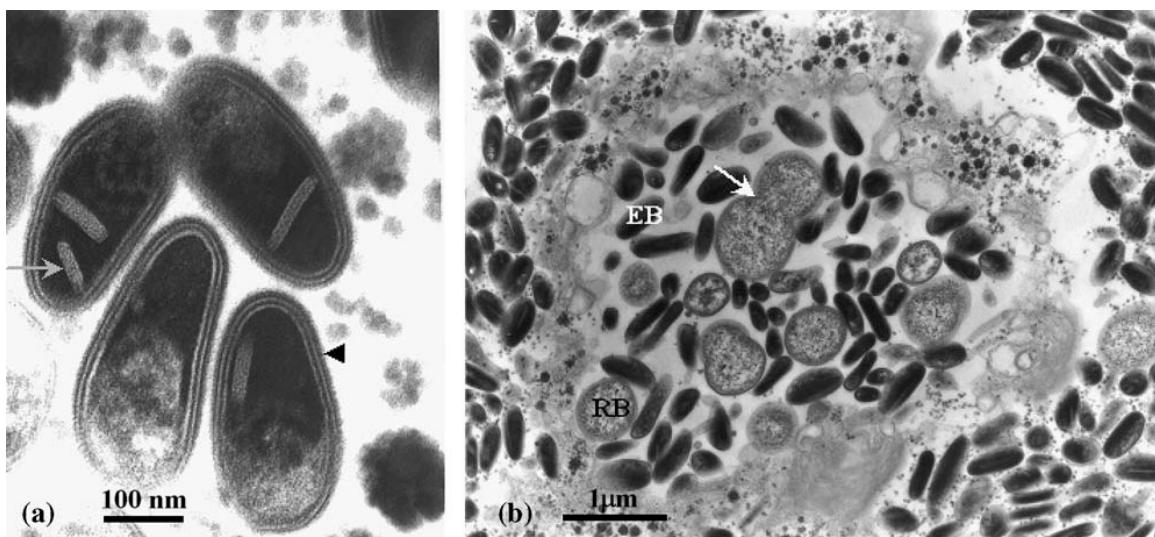


Slika 2: A) Presevna elektronska mikrografija bakterij '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' znotraj membranskih vakuol v okuženih celicah hepatopankreasa pri kopenskem enakonožcu *P. scaber*. Črne konice označujejo paličasta elementarna telesca; bele konice označujejo retikularna telesca; črne puščice označujejo intermediarna telesca. B) Presevni elektronski mikrograf elementarnih teles bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'. Črne konice označujejo petslojno celično steno; bele konice označujejo elektronsko manj goste podolgovate strukture v elektronsko gostejši citoplazmi. (Kostanjšek in sod., 2004: 545)

Vse oblike celic se barvajo po gramu negativno, v celičnih ovojnicih pa ni opaznega peptidoglikanskoga sloja. V okuženih celicah hepatopankreasa so bakterije prisotne v membranskih vakuolah, ki se zaradi razmnoževanja bakterij v njih povečajo na 30 µm v premeru. Vakuole in skupki vakuol s klamidijami so vidni kot bele lise v okuženih žlezah hepatopankreasa. Vakuole, ki večinoma vsebujejo elementarna telesca, se sprostijo v lumen hepatopankreasa, pri čemer prihaja do poškodb gostiteljskih celic. Zato je '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' označena kot znotrajcelični parazit (Kostanjšek in sod., 2004). Pri okuženih populacijah ni opaziti večje smrtnosti, kar verjetno nakazuje, da so kopenski enakonožni raki *P. scaber* naravni gostitelj bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'.

2.1.2.2 '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*'

Bakterijo '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' so prepoznali kot povzročitelja bolezni otekanja telesa pri ščurku *Blatta orientalis*. Vakuole z bakterijami so najštevilčnejše v maščobnih celicah, vendar se pojavljajo v celicah skoraj vseh organov. Tako so z elektronsko mikroskopijo potrdili prisotnost teh bakterij v epitelu prebavila, malpighijevih cevkah, hemolimfnih celicah in reproduktivnih organih. Morfološko so zelo podobne bakteriji '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' z značilnimi paličastimi elementarnimi telesci s petslojno celično steno. Elementarna telesca povprečno merijo 300 nm v dolžino in 145 nm v premeru. 600 nm velika kroglasta retikularna telesca so obdana s trislojno celično steno in se delijo z binarno cepitvijo. Opisani pa sta tudi dve vmesni razvojni stopnji oz. intermediarni telesci. Prvo je t.i. ploščato telesce velikosti $515 \times 255 \times 125$ nm, drugo pa kroglasto intermediarno telesce premera 340 nm. Obe vmesni stopnji sta obdani s petslojno celično steno.



Slika 3: '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*'. A) presevna elektronska mikrografija elementarnih teles. Črna konica označuje petslojno celično steno; puščica označuje elektronsko manj goste podolgovate strukture (lamele) v elektronsko gostejši citoplazmi. B) presevna elektronska mikrografija klamidijskega vključka. EB, elementarno telesce; RB, retikularno telesce; puščica označuje delitev retikularnih teles (Corsaro in sod., 2006: 2).

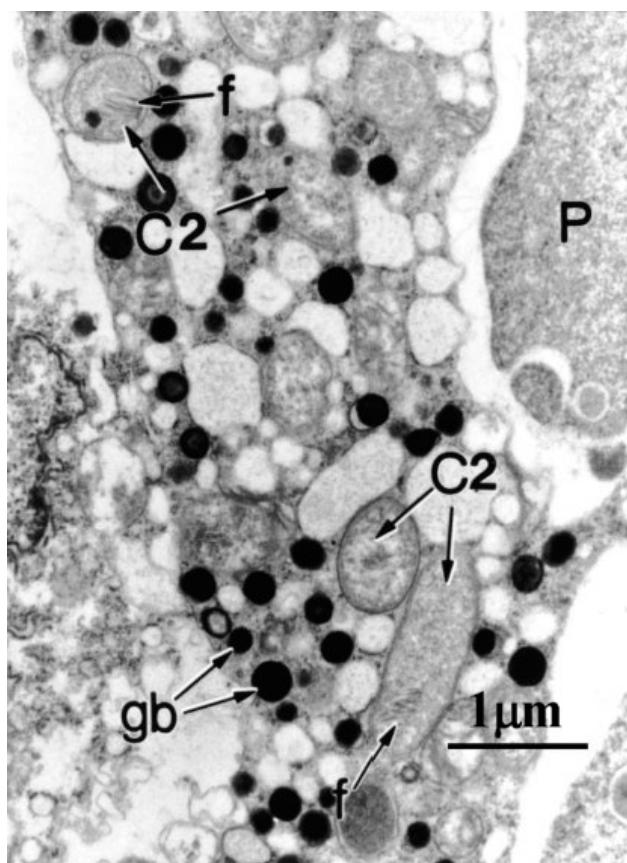
Okužba z bakterijo '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' gostitelja močno prizadene in je tudi smrtna. Reproduktivna sposobnost okužene populacije je izrazito okrnjena (Radek, 2000). Prvotno so na podlagi morfologije in razvojnega cikla bakterijo

'*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' uvrstili v rod *Rickettsiella* in predlagali poimenovanje *Rickettsiella crassificans* (Radek, 2000). Analiza gena za 16S rRNK pa je pokazala, da gre za novega predstavnika reda *Chlamydiales*, ki je glede na primerjavo sekvenc genov za 16S rRNK najbolj podoben bakteriji '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' (Corsaro in sod., 2006).

2.1.2.3 '*Candidatus Fritschea bemisiae*' in '*Candidatus Fritschea eriococci*'

Obe kandidatni klamidiji sta bili odkriti pri žuželkah, ki se prehranjujejo z rastlinskimi sokovi: '*Candidatus Fritschea bemisiae*' pri enakokrilcu *Bemisia tabaci*, '*Candidatus Fritschea eriococci*' pa prav tako pri enakokrilcu, in sicer pri *Eriococcus spurius*. Costa in sod. (1995) so na podlagi presevne elektronske mikroskopije opisali, da so v specializiranih celicah, bakteriocitah, enakokrilca *B. tabaci* poleg primarnih in sekundarnih bakterijskih endosimbiontov opazna dodatna 'globularna telesca' in novi endosimbionti tipa 'C2'. Po ponovnem pregledu so 'globularna' telesca prepoznali kot klamidijska elementarna telesca, endosimbionte 'C2' pa kot klamidijska retikularna telesca. Analiza sekvenc genov za 16S in 23S rRNK genov, pomnoženih v reakciji pomnoževanja s polimerazo s klamidijskimi začetnimi oligonukleotidi, je potrdila prisotnost klamidijskih endosimbiontov v enakokrilcih *B. tabaci* in *E. spurius*. Filogenetsko sta novi klamidiji sorodni vrsti (97% identičnost sekvenc genov za 16S rDNK), ki se uvrščata v nov rod (predlagano rodovno ime *Fritschea* gen. nov.) v družini *Simkaniaceae* (91% identičnost sekvenc genov za 16S rDNK s klamidijo *Simkania negevensis*). Ker novo odkriti klamidiji še nista bili gojeni v čisti kulturi, imata trenutno status kandidatnih vrst '*Candidatus Fritschea bemisiae*' in '*Candidatus Fritschea eriococci*' (Thao in sod., 2003).

Učinek okužbe na gostitelja še ni raziskan. Nekateri posredni dokazi pa vendarle kažejo, da ima okužba s klamidijo '*Candidatus Fritschea bemisiae*' na gostitelja *B. tabaci* verjetno nekatere negativne učinke. *B. tabaci* ima v primerjavi s sorodno vrsto *B. argentifolii*, pri kateri ni dokazanih okužb s klamidijami, slabše razmnoževalne sposobnosti ter počasnejšo rast in razvoj. Čeprav neposrednih dokazov še ni, nekateri znanstveniki domnevajo, da so te razlike posledica klamidijske okužbe (Thao in sod., 2003; Costa in sod., 1995; Everett in sod., 2005).



Slika 4: Presevni elektronski mikrograf vsebine bakteriocite v enakokrilcu *B. tabaci*. C2, retikularna telesca 'Candidatus Fritschea bemisiae'; f, filamentozne strukture v citoplazmi retikularnih teles; gb, elementarna telesca 'Candidatus Fritschea bemisiae'; P, primarni bakterijski (γ -Proteobacteria) endosimbiont *B. tabaci*. (Everett in sod., 2005: 1582)

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vzorci

Uporabili smo vzorce že osamljene DNK iz izbranih tkiv nevretenčarjev, pri katerih so rezultati predhodnih poskusov (Mraz, 2006) nakazali verjetno prisotnost bakterij iz reda *Chlamydiales*. Osamitev DNK je izvedla Jerca Mraz. Izjema je kopenski enakonožni rak *Porcellio scaber*, ki je bil izbran kot referenčna žival za pomnoževanje klamidijskih ribosomskih sekvenc, saj je znano, da žleze hepatopankreasa te živali okužuje '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' (Kostanjšek in sod., 2004). Sekcija živali, prepoznavanje okuženih žlez in odstranitev ter shranjevanje okuženih žlez je potekalo pod mentorstvom doc. dr. Roka Kostanjška z oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Preglednica 2: Seznam nevretenčarjev, iz katerih izolirano skupno DNA smo uporabili v našem delu

Vzorec	Skupina	Vrsta	Tkivo
3	raki (<i>Crustacea</i>), enakonožci (<i>Isopoda</i>)	<i>Porcellio scaber</i>	hepatopankreas
5	pajkovci (<i>Arachnida</i>), pajki (<i>Araneae</i>)	<i>Dsydera ninnii</i>	zadek
10	žuželke (<i>Insecta</i>), ravnokrilci (<i>Orthoptera</i>)	<i>Achaeta domesticus</i>	črevo
14	raki (<i>Crustacea</i>), enakonožci (<i>Isopoda</i>)	<i>Titanethes albus</i>	črevo + hepatopankreas
17	raki (<i>Crustacea</i>), enakonožci (<i>Isopoda</i>)	<i>Asellus aquaticus</i>	hepatopankreas
18	raki (<i>Crustacea</i>), enakonožci (<i>Isopoda</i>)	<i>Asellus aquaticus</i>	zadnje črevo
21	stonoge (<i>Myriapoda</i>), dvojnonoge (<i>Diplopoda</i>)	<i>Julus sp.</i>	črevo
23	stonoge (<i>Myriapoda</i>), dvojnonoge (<i>Diplopoda</i>)	<i>Polydesmus sp.</i>	črevo
25	raki (<i>Crustacea</i>), postranice (<i>Amphipoda</i>)	<i>Gammarus sp.</i>	cela žival
26	raki (<i>Crustacea</i>), postranice (<i>Amphipoda</i>)	<i>Niphargus sp.</i>	cela žival
31	raki (<i>Crustacea</i>), enakonožci (<i>Isopoda</i>)	<i>Porcellionides pruinosus</i>	črevo + hepatopankreas

3.1.2 Kompleti

- komplet za elucijo nukleinskih kislin iz agaroznega gela: QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Frankfurt, Nemčija)
- komplet za čiščenje PCR pomnožkov: High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim, Nemčija)
- komplet za izolacijo plazmidne DNK: High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Mannheim, Nemčija)

3.1.3 Raztopine in puferi

Ime	Sestava
pufer TE, pH 8.0	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM EDTA, pH 8.0
pufer TBE 0,5×	0,045 M Tris-borat 0,001 M EDTA, pH 8.0
pufer TAE 1×	0,04 M Tris-acetat 0,001 M EDTA, pH 8.0
CTAB/NaCl	10% (w/w) heksadeciltrimetilamonijev bromid 0,7 M NaCl
SDS 10%	10% (w/w) natrijev dodecilsulfat
fiziološka raztopina za kopenske členonožce	0,75% (w/w) NaCl
raztopina za alkalno lizo I	50 mM glukoza 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 10 mM EDTA, pH 8.0
raztopina za alkalno lizo II	0,5 M NaOH 1% (w/w) natrijev dodecilsulfat
raztopina za alkalno lizo III	3 M kalijev acetat 11,5% (v/v) led ocetna kislina
raztopina CaCl ₂ za pripravo kompetentnih celic	0,1 M CaCl ₂
X-gal	20 mg/ml 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranoid v dimetilformamidu

3.1.4 Sevi

Pri poskusih kloniranja smo uporabljali sev bakterije *Escherichia coli* TOP10.

F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80lacZΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *araD139* *galU* *galK*
Δ(*ara-leu*)1697 *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*

3.1.5 Gojišča

Uporabljali smo gojišče LB (Luria-Bertani), ki je specifično prilagojeno za gojenje *E. coli*, in sicer tako tekoča kot trdna gojišča LB. Pri pripravi kompetentnih celic smo potrebovali tekoče gojišče LB z antibiotikom streptomycinom končne koncentracije 100 µg/ml. Za kloniranje pa smo uporabljali tako tekoča kot trdna gojišča LB z antibiotikom ampicilinom končne koncentracije 100 µg/ml.

Tekoče gojišče LB smo po avtoklaviraju ohladili na sobno temperaturo in dodali antibiotik, ob upoštevanju aseptičnih tehnik do ustrezne končne koncentracije.

Trdno gojišče LB smo po avtoklaviraju ohladili na 50-55°C, sterilno dodali antibiotik in ga razlili v sterilne plastične petrijevke.

Za pripravo LB gojišč smo uporabili že pripravljene mešanice LB Broth, Miller in LB Agar, Miller proizvajalca Difco laboratories (Detroit, ZDA).

Recept za pripravo enega litra tekočega LB:

25 g mešanice LB Broth (vsebuje 10 g NaCl, 10 g triptona in 5 g kvasnega ekstrakta) na 1000 ml destilirane vode.

Recept za pripravo enega litra trdnega LB:

40 g mešanice LB Agar (vsebuje 10 g NaCl, 10 g triptona, 5 g kvasnega ekstrakta in 15 g agarja) na 1000 ml destilirane vode.

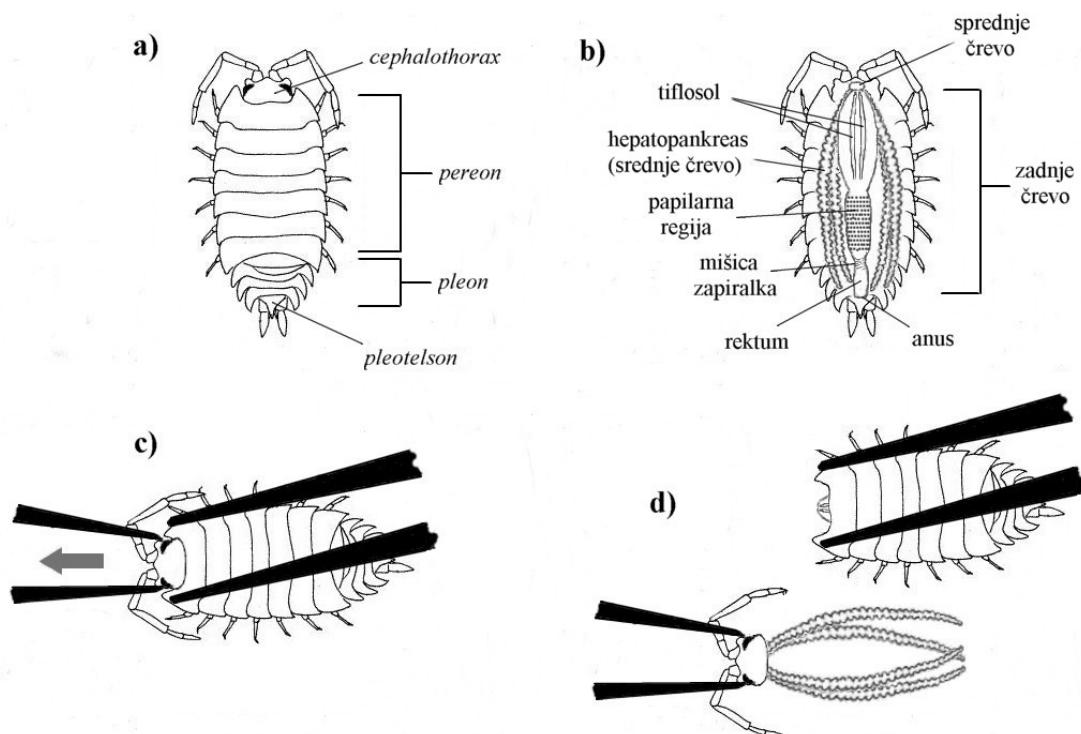
3.2 METODE

3.2.1 Sekcija enakonožnih rakov *Porcellio scaber* in odvzem okuženih žlez hepatopankreasa

Živali smo evtanazirali s potopitvijo v absolutni etanol. Nato smo jih sprali s fiziološko raztopino (0,75% NaCl) in jih prenesli v kapljo fiziološke raztopine v sterilni plastični petrijevki, ki smo jo namestili na mizico binokularne lupe. Samo sekcijsmo izvedli z dvema koničastima pincetama. Z eno smo žival držali, z drugo pa previdno odstranili glavo (Slika 5). Štirje režnji hepatopankreasa (srednje črevo) so neposredno povezani s proventrikлом (želodcem), ki skupaj s požiralnikom tvori prednji del prebavila. Ker je ta del relativno močno povezan z eksoskeletom glave, smo lahko z odstranitvijo glave učinkovito in enostavno ločili sprednje črevo in žleze hepatopankreasa od zadnjega črevesa in trupa.

Režnje hepatopankreasa smo pregledali z lupo. Znaki okužbe z znotrajcelično bakterijo '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' se kažejo kot bele lise na hepatopankreasu in so vidne tudi s prostim očesom.

Okužene žleze smo s skalpelom ločili od sprednjega črevesa in jih prenesli v mikrocentrifugirko z absolutnim etanolom. Shranili smo jih pri temperaturi -20°C.



Slika 5: *Porcellio scaber*: a) splošna anatomijska; b) zgradba prebavila; c, d) shema sekcije

3.2.2 Izolacija skupne mikrobne DNK

Protokol izolacije skupne mikrobne DNK po metodi z ultrazvokom in CTAB smo izbrali zato, ker se je glede na predhodne izkušnje ta metoda izkazala kot najučinkovitejša za izolacijo DNK za pridobivanje pomnožkov z verižno reakcijo s polimerazo (Mraz, 2006).

Žleze hepatopankreasa enakonožnega raka *Porcellio scaber* smo iz absolutnega etanola prenesli v sterilno mikrocentrifugirko in posušili na zraku. Posušene žleze smo homogenizirali v keramični terilnici ob dodatku 200 µl pufra TE. Homogenizat smo s pipeto prenesli v sterilno mikrocentrifugirko in centrifugirali 10 minut pri 13000 × g. Supernatant smo odstranili, usedlino pa resuspendirali v 600 µl pufra TE. Vzorec smo dodatno homogenizirali z ultrazvokom s sonikatorjem Soniprep 150, ultrasonic disintegrator (ISTCP Inc., New Jersey, ZDA) v treh ciklih po 30 sekund, z vmesnimi 30-sekundnimi prekinittvami. Med ultrazvočno homogenizacijo smo vzorec hranili na ledu. Homogenizat smo nato centrifugirali 10 minut pri 12000 × g. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 100 µl 5 M NaCl, premešali in dodali še 80 µl 10-

odstotnega CTAB v 0,7-odstotnem NaCl, segretega na 65°C. Mešanico smo inkubirali 10 minut pri 65°C. Sledila je ekstrakcija nukleinskih kislin z enakim volumnom kloroformom. Mešanico smo centrifugirali 10 minut pri $12000 \times g$, zgornjo vodno fazo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in ponovili ekstrakcijo z enakim volumnom mešanice fenol-kloroform-izoamilalkohol (25:24:1). Po ponovnem 10-minutnem centrifugiranju pri $12000 \times g$ smo vodno fazo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in raztopljene nukleinske kisline oborili z dodatkom 0,6-kratnega volumna izopropanola. Mešanico smo centrifugirali 15 minut pri $14000 \times g$, odstranili supernatant in stene mikrocentrifugirke sprali z 1 ml ledeno hladnega 70-odstotnega etanola. Po 10-minutnem centrifugiranju pri $14000 \times g$ smo odstranili supernatant, oborjene nukleinske kisline pa posušili na zraku in jih raztopili v 35 µl pufra TE.

3.2.3 Pomnoževanje bakterijskih genov za 16S rRNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Za pomnoževanje tarčnih odsekov genov za 16S rRNK smo uporabili termostat My Cycler™, thermal cycler (BioRad, ZDA). Vse reakcijske mešanice smo pripravili v 200 µl mikrocentrifugirkah (MicroAmp, Elmer Perkin, ZDA).

Osnovne 20 µl reakcije so vsebovale 2 µl 10-kratnega *Taq* pufra, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM mešanico deoksiribonukleozid trifosfatov (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 8 pmol (0,4 mM) vsakega začetnega oligonukleotida, 1 enoto rekombinantne *Taq* polimeraze DNK in 1 µl ustrezno redčenega vzorca DNK. Vse uporabljeni kemikaliji izdeluje Fermentas MBI, Litva. Volumen mešanic smo dopolnili do 20 µl s sterilno destilirano vodo za celične kulture (Sigma, ZDA).

Preglednica 3: Seznam in značilnosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov

Začetni oligonukleotid	Sekvenca	Mesto naleganja ^a	Vir
Chl_16S(270)f	5' – GAC GTC TAG GCG GRY TGA GAG – 3' ^{b, c}	okoli 270	Mraz, 2006
Chl_16S(530)r	5' – GWA TTA CCG CRG CKG CTG – 3' ^{b, d, e}	522 – 539	Mraz, 2006
Chl_16S(1300)r ^h	5' – CCA TGA TGT GAC GGG CGG – 3'	okoli 1300	Everett in Andersen, 1997
1392R	5' – GYA CAC ACC GCC CGT – 3' ^b	1392 – 1406	Lane D. J., 1991
R1401	5' – CGG TGT GTA CAA GAC CC – 3'	1385 – 1401	Nübel in sod., 1996
Chla-2-18-f	5' – CGG ATC CTG AGA ATT TGA TC – 3'	-2 – 18	Pudjiatmoko in sod., 1997
Chl_16S(270)fpst	5' – GGC CCT GCA GGA CGT CTA GGC GGR YTG AGA G – 3' ^{b, c}	okoli 270	to delo
Chl_16S(530)rpst	5' – GGC CCT GCA GGW ATT ACC GCR GCK GCT G – 3' ^{b, d, e}	522 – 539	to delo
M13r ^f	5' – CAG GAA ACA GCT ATG ACC – 3'	463 – 480 ^g	www.microsynth.ch/150.0.html

a: mesto naleganja je podano glede na gen za 16S rRNK pri *E. coli* K12

b: R = A ali G

c: Y = C ali T

d: W = A ali T

e: K = G ali T

f: začetni oligonukleotid za sekvenčne reakcije

g: mesto naleganja je podano za plazmid pUC18

h: gre za reverzni komplement začetnega oligonukleotida 16SF2, objavljenega v navedenem viru

Preglednica 4: Osnovni PCR protokoli

Protokol	1	2	3	4	5
Začetna oligonukleotida	Chl_16S(270)f Chl_16S(530)r	Chl_16S(270)f Chl_16S(1300)r	Chl_16S(270)f 1392R	Chl_16S(270)f R1401	Chla-2-18-f Chl_16S(1300)r
Dolžina produkta (~bp)	260	1100	1100	1100	1300-1400
Začetna denaturacija 94°C (s)	180	180	180	180	180
Število ciklov	30	30	30	30	30
Denaturacija 94°C (s)	30	40	40	40	40
Prileganje T/t (°C/s)	58/40	60/30	60/30	60/30	57/30
Polimerizacija 72°C (s)	20	80	80	80	80
Podaljšana polimerizacija 72°C (s)	300	600	600	600	600

3.2.4 Agarozna gelska elektroforeza

Za ločevanje PCR pomnožkov smo uporabili horizontalno agarozno gelsko elektroforezo. Gele smo pripravili s segrevanjem ustrezne količine agaroze Seakem® LE Agarose (Cambrex Bio Science Rochland Inc., Rochland, USA) v 0,5-kratnem pufru TBE. Uporabljali smo 1-, 1,5- in 2-odstotne (w/v) agarozne gele. Polimerizacija je potekala pri sobni temperaturi. Samo elektroforetsko ločevanje je potekalo v 0,5-kratnem pufru TBE pri napetostih 80 do 100 V. Po končani elektroforezi smo gele barvali 5 do 15 minut v raztopini etidijevega bromida koncentracije 1 µg/ml in jih nato 15 do 30 minut razbarvali v destilirani vodi. Zlasti za odkrivanje nastalih nespecifičnih PCR produktov pri pomnoževanju tarčnih odsekov genov za 16S rRNA smo uporabljali barvilo SYBR Gold (Invitrogen SYBR Gold nucleic acid gel stain, Molecular Probes Inc., Eugene, ZDA). Z barvilom SYBR Gold smo gele barvali 30 do 40 minut v 1-kratni raztopini barvila v 1-kratnem pufru TAE in jih nato 10 minut razbarvali v destilirani vodi. Gele, barvane z

etidijevim bromidom, smo pregledovali v transiluminatorju Gel Doc 1000 s sistemom za zajemanje in obdelavo slike Molecular Analyst 1.4 (BioRad, Hercule, ZDA), gele, barvane z barvilom SYBR Gold, pa z aparatom Chemi Genious2 (Bio ImagingSystem, Syngene, Velika Britanija).

3.2.5 Osamitev PCR pomnožkov iz agaroznega gela

Pri določenih vzorcih so kljub optimizaciji PCR protokola nastajali nespecifični pomnožki. PCR pomnožke smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo v 1,5-odstotnem gelu pri napetosti 80V in gel barvali v etidijevem bromidu. Na transiluminatorju Reprostar II (Camag, Švica) smo iz gela s sterilnim skalpelom izrezali proge pomnožkov ustreznih dolžin in jih osamili iz gela s kompletom za elucijo nukleinskih kislin iz agaroznega gela (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) po navodilih proizvajalca.

3.2.6 Kloniranje

3.2.6.1 Priprava kompetentnih celic

Kompetentne celice smo pripravili po metodi s CaCl_2 . Tri ml tekočega gojišča LB s streptomycinom smo cepili z *E. coli* TOP10 in inkubirali preko noči (~16h) v stresalniku pri 37°C in frekvenci 225 stresajev/min. 0,5 ml kulture smo prenesli v 50 ml svežega tekočega gojišča LB in inkubirali pri 37°C in frekvenci 300 stresajev/min, dokler kultura ni dosegla absorbance (OD_{600}) 0,4 do 0,5. Kulturo smo prenesele v ledeno hladne centrifugirke in jih 20 minut inkubirali na ledi. Nato smo kulturo centrifugirali 10 minut pri $2300 \times g$ in 4°C . Supernatant smo odlili in s pipeto odstranili ostanke gojišča. Usedek smo previdno resuspendirali v 10 ml ledeno hladnega 0,1 M CaCl_2 in inkubirali na ledi 20 minut. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri $2300 \times g$ in 4°C . Supernatant smo odlili, s pipeto odstranili ostanke supernatanta in usedle celice resuspendirali v 2 ml 15-odstotne (v/v) raztopine glicerola v 0,1 M CaCl_2 . Tako pripravljeno suspenzijo celic smo alikvotirali po 100 μl v ledeno hladne sterilne mikrocentrifugirke in jih hipno zamrznili v absolutnem etanolu, ohljenem na -70°C . Celice smo shranili pri -70°C .

3.2.6.2 Namnoževanje in izolacija plazmida pUC18

Plazmid pUC18 smo transformirali v kompetentne celice *E. coli* TOP10 po sledečem postopku: Suspenzijo 100 µl kompetentnih celic v mikrocentrifugirki smo odtajali na ledu. Suspenziji smo dodali 1 µl raztopine plazmida pUC18, previdno premešali in inkubirali 30 minut na ledu. Celice smo nato izpostavili topotnemu šoku, tako da smo mikrocentrifugirko s suspenzijo 30 sekund inkubirali v vodni kopeli pri 42°C in jo nato nemudoma prenesli na led. Dodali smo 500 µl tekočega gojišča LB sobne temperature in suspenzijo horizontalno stresali 1 uro pri 37°C in frekvenci 200 stresajev/min. Po 300 µl suspenzije transformiranih celic smo razmazali na trdna gojišča LB z dodanim ampicilinom. Antibiotik ampicilin deluje kot selektivni dejavnik, ki omogoča rast le uspešno transformiranim celicam, ki so pridobile na plazmidu pUC18 zapisano rezistenco proti ampicilinu (gen *blaTEM-1*). Inokulirana gojišča smo inkubirali preko noči pri 37°C.

Plazmid pUC18 smo izolirali po metodi z alkalno lizo in SDS za srednje velike volumne. V dve stekleni epruveti s po 5 ml tekočega LB gojišča z ampicilinom smo prenesli po eno kolonijo s pUC18 transformiranih celic *E. coli* TOP10 s trdnega gojišča LB z ampicilinom. Nacepljena gojišča smo stresali pri 37°C in frekvenci 225 stresajev/min preko noči (približno 16 ur). Kulturo smo nato centrifugirali 10 minut pri 2000 × g in 4°C. Gojišče smo odlili in s pipeto odstranili preostale kapljice. Bakterijske celice smo resuspendirali v po 1,5 ml pufra TE, prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirki in ponovno centrifugirali 10 minut pri 2000 × g in 4°C. Supernatant smo odstranili in celice resuspendirali v po 200 µl ledeno hladne raztopine za alkalno lizo I. Nato smo dodali 400 µl sveže pripravljene raztopine za alkalno lizo II in previdno ročno premešali z obračanjem mikrocentrifugirke. Mešanici smo dodali 300 µl ledeno hladne raztopine za alkalno lizo III, vsebino ročno premešali z obračanjem mikrocentrifugirke in inkubirali 5 minut na ledu. Nato smo bakterijski lizat centrifugirali 10 minut pri 15000 × g in 4°C. Supernatant (približno 600 µl za vsako mikrocentrifugirko) smo prenesli v novi mikrocentrifugirki, dodali enak volumen mešanice fenol-kloroform-izoamilalkohol v razmerju 25:24:1 in dobro premešali. Emulzijo smo centrifugirali 2 minuti pri 15000 × g in 4°C ter zgornjo vodno fazo prenesli v novi mikrocentrifugirki. Nukleinske kisline smo oborili z dodatkom 600 µl izopropanola pri sobni temperaturi, previdno premešali in centrifugirali 10 minut pri 15000 × g in 4°C.

Supernatant smo odstranili, oborjenim nukleinskim kislinam dodali 1 ml ledeno hladnega 70-odstotnega etanola in ponovno centrifugirali 10 minut pri $15000 \times g$ in 4°C . Etanol smo odstranili in oborino posušili na zraku pri sobni temperaturi. Nukleinske kisline smo raztopili v po 50 μl pufra TE (pH 8.0) z RNazo A (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

3.2.6.3 Restrikcija in ligacija plazmida pUC18 in PCR pomnožkov

Za usmerjeno kloniranje PCR pomnožkov smo same pomnožke in izolirani plazmid pUC18 najprej rezali z restriktivno endonukleazo *PstI* (Fermentas MBI, Litva). Restriktivne mešanice so vsebovale različne volumne očiščenih PCR pomnožkov, saj je pomnoževanje pri različnih vzorcih potekalo različno učinkovito. Volumne raztopin očiščenih pomnožkov smo določili glede na jakost prog po pregledu agaroznih gelov.

Preglednica 5: Sestava restriktivnih mešanic

Oznaka vzorca	Vzorec (μl)	10× Pufer 0 (μl)	<i>PstI</i> 10U/ μl (μl)	Skupni volumen (μl)	Restriktivno mesto <i>PstI</i>
3	10,0	1,2	1,5	12,0	5'-C T G C A [↓] G-3' 3'-G _↑ A C G T C-5'
5	10,0	1,2	1,5	12,0	
14	30,0	3,5	1,5	35,0	
17	43,5	5,0	1,5	50,0	
21	43,5	5,0	1,5	50,0	
23	30,0	3,5	1,5	35,0	
25	10,0	1,2	1,5	12,0	
26	43,5	5,0	1,5	50,0	
pUC18	25,5	3,0	1,5	30,0	

Reakcijske mešanice smo pripravili v mikrocentrifugirkah in jih inkubirali preko noči pri 37°C . Nato smo v vsako mešanico dodali dodatnih 0,6 μl (6 enot) raztopine encima *PstI* in inkubirali še 2 uri pri 37°C . Po končani restrikciji smo vzorce očistili s kompletom za čiščenje PCR pomnožkov 'High Pure PCR Product Purification Kit' (Roche, Mannheim, Nemčija) po navodilih proizvajalca.

Za ligacijo tarčnih PCR pomnožkov v vektor pUC18 smo pripravili 10 μl reakcije. Za vse vzorce so ligacijske mešanice vsebovale 1 μl s *PstI* rezanega pUC18, 1 μl 10-kratnega ligacijskega pufra, 0,2 μl (1 enota) DNK ligaze T4 (Fermentas, Hannover, Nemčija), ustrezno količino rezanega in očiščenega PCR pomnožka in sterilno destilirano vodo za

celične kulture (Sigma). Pri dodajanju PCR pomnožkov smo upoštevali, da mora biti molsko razmerje med pomnožkom in vektorjem približno 1:1. Ligacijske mešanice smo inkubirali 1 uro pri 22°C.

Kompetentne celice smo transformirali s po 7,5 µl ligacijske mešanice po postopku, navedenem v podpoglavlju 3.2.6.2. Različne alikvote (20 µl, 50 µl, 100 µl in 200 µl) transformacijskih mešanic smo razmazali na trda gojišča LB z dodanim ampicilinom, na katera smo predhodno enakomerno nanesli po 40 µl substrata X-gal. Nacepljena gojišča smo inkubirali preko noči (do 16 ur) pri 37°C. Substrat X-gal omogoča ločevanje med celicami, transformiranimi zgolj s plazmidom in celicami, transformiranimi s plazmidom z vstavljenim PCR pomnožkom. Gre za t.i. modro-belo selekcijo, ki temelji na β-galaktozidazni aktivnosti. Celice, transformirane zgolj s plazmidom, izražajo aktivno β-galaktozidazo (gen *lacZ*), ki cepi β-glikozidno vez v analogu lakteze X-gal. Ta razpade na D-galaktozo in 5-bromo-4-kloro-indoksil, ki se neencimatsko dimerizira in oksidira v barvni produkt 5,5'-dibromo-4,4'-dikloro-indigo. Te celice tvorijo modre kolonije. Celice transformirane s plazmidom z vstavljenim PCR pomnožkom pa ne izražajo aktivne β-galaktozidaze, saj je v gen *lacZ* na plazmidu vstavljen PCR pomnožek. Posledično tvorijo te celice bele kolonije. Če sev bakterije vsebuje gen *lacI* (gen za sintezo represorja *lac* operona), je na gojišča potrebno nanesti tudi induktor *lac* operona IPTG. V genomu *E. coli* TOP10 je gen *lacI* izbrisani, zato na gojišča ni bilo potrebno nanesti IPTG.

Na podlagi modro-bele selekcije smo za vsak vzorec izbrali 12 belih kolonij in jih zaradi velike gostote kolonij na ploščah s cepilno zanko razmazali do posameznih kolonij na sveža trdna gojišča LB z ampicilinom in X-gal. Postopek smo ponavljali, dokler niso na ploščah zrasle le bele kolonije.

3.2.6.4 Izolacija plazmidne DNK

Kolonije transformiranih celic *E. coli* TOP10, izbrane na podlagi modro-bele selekcije, smo prenesli v 4 ml tekočega gojišča LB z ampicilinom in jih inkubirali preko noči na stresalniku pri 37°C in 200 stresajev/min. Po 1,5 ml kulture smo prenesli v sterilno mikrocentrifugirko in centrifugirali pri 9000 × g in 4°C. Supernatant smo odstranili in

dodali še 1,5 ml kulture ter ponovili centrifugiranje. Supernatant smo odstranili in nadaljevali izolacijo plazmidne DNK s kompletom za izolacijo plazmidne DNK 'High Pure Plasmid Isolation Kit' (Roche, Mannheim, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Izolacija plazmidne DNK s kompletom 'High Pure Plasmid Isolation Kit' temelji na sprostivti plazmidne DNK iz celic z alkalno lizo. Kromosomska DNK ostane vezana na ostanke celic, RNaza v pufru za resuspendiranje usedka celic pa razgradi iz celic sproščeno RNK. Filter iz steklenih vlaken v namenski mikrocentrifugirki omogoči selektivno vezavo plazmidne DNK v prisotnosti ustreznih soli. Skozi serijo korakov spiranja se odstranijo nečistoče, vezano plazmidno DNK pa eluiramo z raztopino soli v nizkih koncentracijah.

Izolirano plazmidno DNK smo rezali z restriktijsko endonukleazo *PstI*. Pripravili smo 10 µl restriktijske mešanice, ki so vsebovale po 4 µl raztopine plazmidne DNK, 1 µl 10-kratnega restriktijskega pufra, 0,8 µl (8 enot) encima *PstI* in 4,2 µl sterilne destilirane vode za celične kulture (Sigma). Restriktijske mešanice smo inkubirali preko noči pri 37°C. Nastale produkte smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo v 1,5-odstotnem gelu, gele barvali v etidijevem bromidu in jih pregledali.

3.2.7 Sekvenciranje in sekvenčna analiza

Na podlagi restriktijske analize s *PstI* smo izbrali klone za sekvenciranje. Sekvenciranje so izvedli po naročilu v podjetju Microsynth AG (Baglach, Švica). Za sekvencijski začetni oligonukleotid smo izbrali M13r.

Tako pridobljene sekvence smo primerjali s sekvencijskimi kromatogramomi in po potrebi sekvence ustrezzo popravili. Sekvencam smo z algoritmoma BlastN in Fasta3 na spletnih straneh [baz podatkov 'GenBank'](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) in 'EMBL Nucleotide Database', EBI (<http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>) poiskali najbolj podobne sekvence.

4 REZULTATI

4.1 Specifičnost uporabljenih začetnih oligonukleotidov

Specifičnost uporabljenih začetnih oligonukleotidov smo preverili na spletni strani baze podatkov 'Ribosomal Database Project II' z orodjem 'Probe match' (<http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>). V analizo smo vključili le sekvence, dolge vsaj 1200 nukleotidov, tj. 101877 bakterijskih sekvenc, od katerih je 174 pripadalo redu *Chlamydiales*. Podatki veljajo za dan 18.9.2006.

Preglednica 6: Rezultati *in silico* analize specifičnosti začetnih oligonukleotidov

Začetni oligonukleotid	Zadetki brez napak		Zadetki z eno napako		Zadetki z dvema napakama	
	Specifični zadetki (št./%)	Nespecifični zadetki (št.)	Specifični zadetki (št./%)	Nespecifični zadetki (št.)	Specifični zadetki (št./%)	Nespecifični zadetki (št.)
Chl_16S(270)f	171/98,3	0	174/100	0	174/100	19
Chl_16S(530)r	171/98,3	90785	174/100	100339	174/100	101306
Chl_16S(1300)r	144/82,8	323	149/85,6	35049	150/86,2	45345
Chla-2-18-f	1/0,6	0	1/0,6	0	1/0,6	0
Chla-2-18-f ^a	61/35,1	0	66/37,9	39	67/38,5	3460
Chla-2-18-f ^b	66/37,9	0	66/37,9	491	112/64,4	9113
1392R	149/85,6	69680	151/86,8	73802	151/86,8	74542
R1401	22/12,6	13798	150/86,2	68918	151/86,8	74261

a: gre za delno sekvenco (5' – CTG AGA ATT TGA TC – 3')

b: gre za delno sekvenco (5' – TG AGA ATT TGA TC – 3')

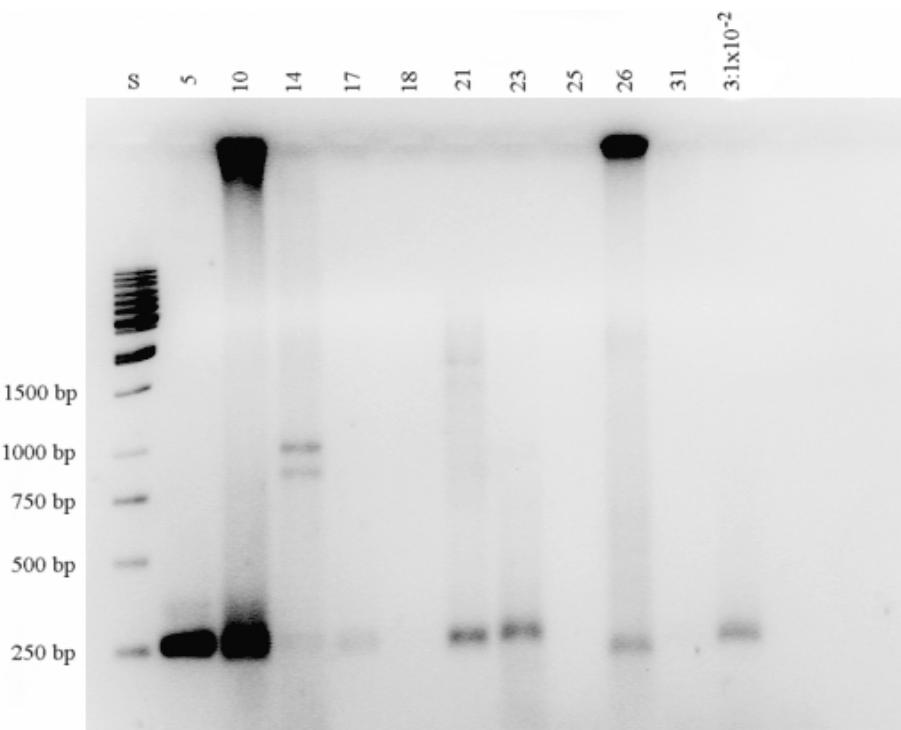
Ker smo za začetni oligonukleotid Chla-2-18-f (5' – CGG ATC CTG AGA ATT TGA TC – 3') dobili izredno malo zadetkov, smo iskanje z orodjem 'Probe match' ponovili z delnimi sekvencami, pri čemer smo izpustili prvih 6 oz. 7 nukleotidov s 5' strani. Tako je iskanje za skrajšani sekvenci Chla-2-18-f^a (5' – CTG AGA ATT TGA TC – 3') in Chla-2-18-f^b (5' – TG AGA ATT TGA TC – 3') dalo precej večje število zadetkov (Preglednica 6). Na podlagi teh podatkov in dejstva, da se začetni oligonukleotid Chla-2-18-f v objavah označuje kot širše klamidijsko specifičen začetni oligonukleotid (Pudjatmoko in sod., 1997; Kostanjšek in sod., 2004), sklepamo, da je verjetno ta začetni oligonukleotid

uporaben za pomnoževanje genov za 16S rRNK za širši krog predstavnikov reda *Chlamydiales*, kot pa kaže naša analiza. Predvidevamo, da je nizko število zadetkov posledica narave sekvenc klamidijskih genov za 16S rRNK, deponiranih v bazi podatkov RDP II. Sumimo, da začetni oligonukleotid Chla-2-18-f prilega na sekvenco, katere vsaj del leži pred začetkom sekvence genov za 16S rRNK.

1392R in R1401 sta splošna, široko specifična bakterijska začetna oligonukleotida. Posledično je število zadetkov zunaj reda *Chlamydiales*, pridobljenih z našo analizo, zelo visoko.

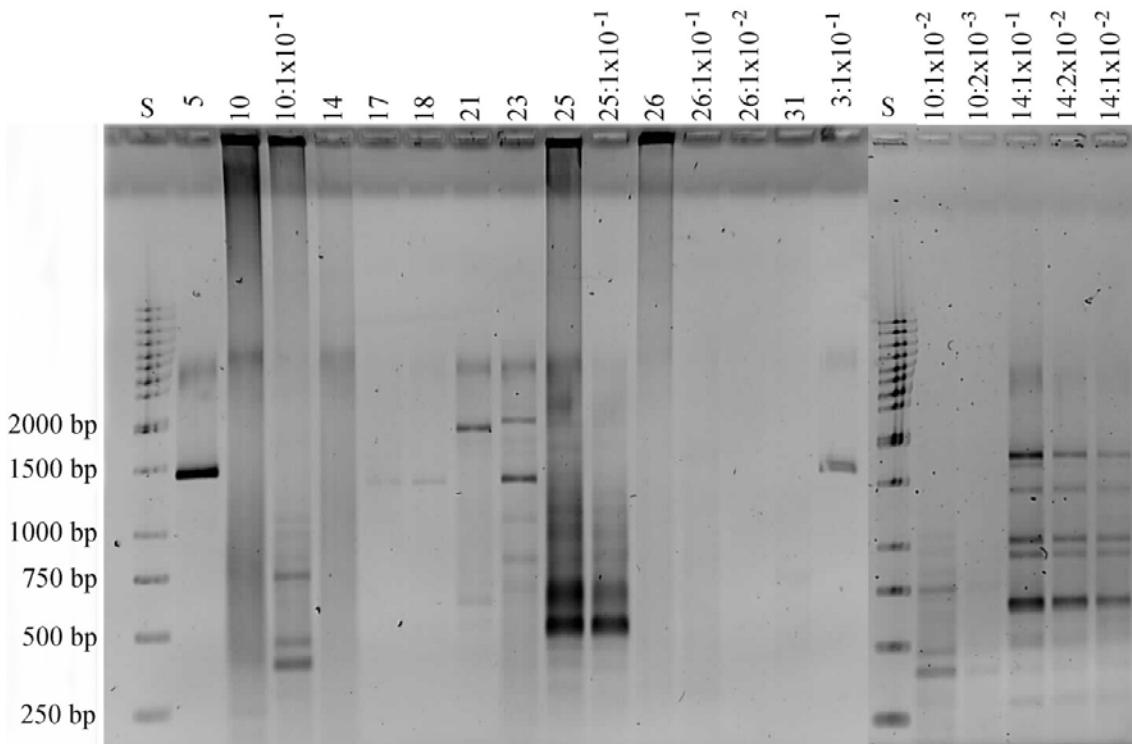
4.2 Pomnoževanje klamidijskih 16S rRNK genov v verižni reakciji s polimerazo (PCR)

Za potrditev prisotnosti klamidijskih genov za 16S rRNK v naših vzorcih smo izvedli verižno reakcijo s polimerazo z začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)f in Chl_16S(530)r.



Slika 6: Na 1% agarozni gel naneseni s PCR pomnoženi deli genov za 16S rRNK vseh vzorcev s klamidijskima začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)f in Chl_16S(530)r. S – velikostni standard 1kb 'O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder' (Fermentas). Vrednosti za dvopičjem predstavljajo redčitev vzorca osamljenih nukleinskih kislin.

Pomnožke genov za 16S rRNK ustreerne velikosti (260bp) smo pomnožili pri osmih od skupno enajst vzorcev, čeprav rezultati predhodne analize kažejo, da bi morali uspešno pomnožiti ustreerne dele bakterijskih genov za 16S rRNK pri vseh enajstih vzorcih (Mraz, 2006; podpoglavlje 5.1.2). Daljše odseke klamidijskih genov za 16S rRNK smo skušali pomnožiti z različnimi pari začetnih oligonukleotidov. Pregled uspešnosti namnoževanja tarčnih odsekov klamidijskih genov za 16S rRNK je predstavljen v preglednici 7.



Slika 7: Na 1% agarozni gel naneseni s PCR s klamidijskima začetnima oligonukleotidoma Chla-2-18-f in Chl 16S(1300)r pomnoženi deli genov za 16S rRNK vseh vzorcev. S – velikostni standard 1kb 'O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder' (Fermentas). Vrednosti za dvopičjem predstavljajo redčitev vzorca osamljenih nukleinskih kislin.

Opomba: slika je sestavljena iz dveh gelov. Ker je vsak gel neponovljiv, se tudi hitrost potovanja pomnožkov med geli razlikuje.

Preglednica 7: Uspešnost pomnoževanja klamidijskih genov za 16S rRNK

Vzorci	Pari začetnih oligonukleotidov					
	Chl_16S(270)f Chl_16S(530)r	Chl_16S(270)f Chl_16S(1300)r	Chl_16S(270)f 1392R	Chl_16S(270)f R1401	Chla-2-18-f Chl_16S(1300)r	Chl_16S(270)fpst Chl_16S(530)rpst
3	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+, ●	+	+, ●
10	+, ●	+	+	-	-, ●	+, ●
14	+, ●	-	-	-	+, ●	+, ●
17	+	+, ●	-	-	+	+
18	-	-, ●	-	-	+	-
21	+, ●	+, ●	-	-	-, ●	+
23	+	+, ●	-	-	+, ●	+, ●
25	-	+, ●	+	+	-, ●	+, ●
26	+	-	-	-	-	+
31	-	-	-	-	-	-

+ : prisotnost pomnožkov ustrezone velikosti

- : odsotnost pomnožkov ustrezone velikosti

● : prisotnost nespecifičnih pomnožkov

4.2.1 Modifikacija izbranega PCR protokola in začetnih oligonukleotidov za kloniranje

Vsi pari začetnih oligonukleotidov, s katerimi smo želeli pomnožiti daljše odseke klamidijskih 16S rRNK genov, so se izkazali za suboptimalne. Pri številnih vzorcih je v reakciji pomnoževanja s polimerazo, poleg tarčnega pomnožka, nastalo tudi večje število nespecifičnih pomnožkov, ali pa tarčnega pomnožka nismo uspeli pomnožiti (Preglednica 7, Slika 7). Zato smo, kljub manjši informativni vrednosti krajsih sekvenc, za pomnoževanje delov klamidijskih 16S rRNK genov za kloniranje izbrali začetna oligonukleotida Chl_16S(270)f in Chl_16S(530)r. Oba izbrana začetna oligonukleotida smo za potrebe pridobivanja klamidijskih 16S rDNK pomnožkov za usmerjeno kloniranje spremenili tako, da smo dodali kratko sekenco, ki smo jo v toku sinteze oligonukleotida sintetizirali na 5' koncu oligonukleotida in je vsebovala tarčno mesto za restriktijsko endonukleazo *PstI* (Preglednica 3). Spremenjena začetna oligonukleotida Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst so po naročilu izdelali v podjetju MWG-BIOTECH AG (Ebersberg, Nemčija).

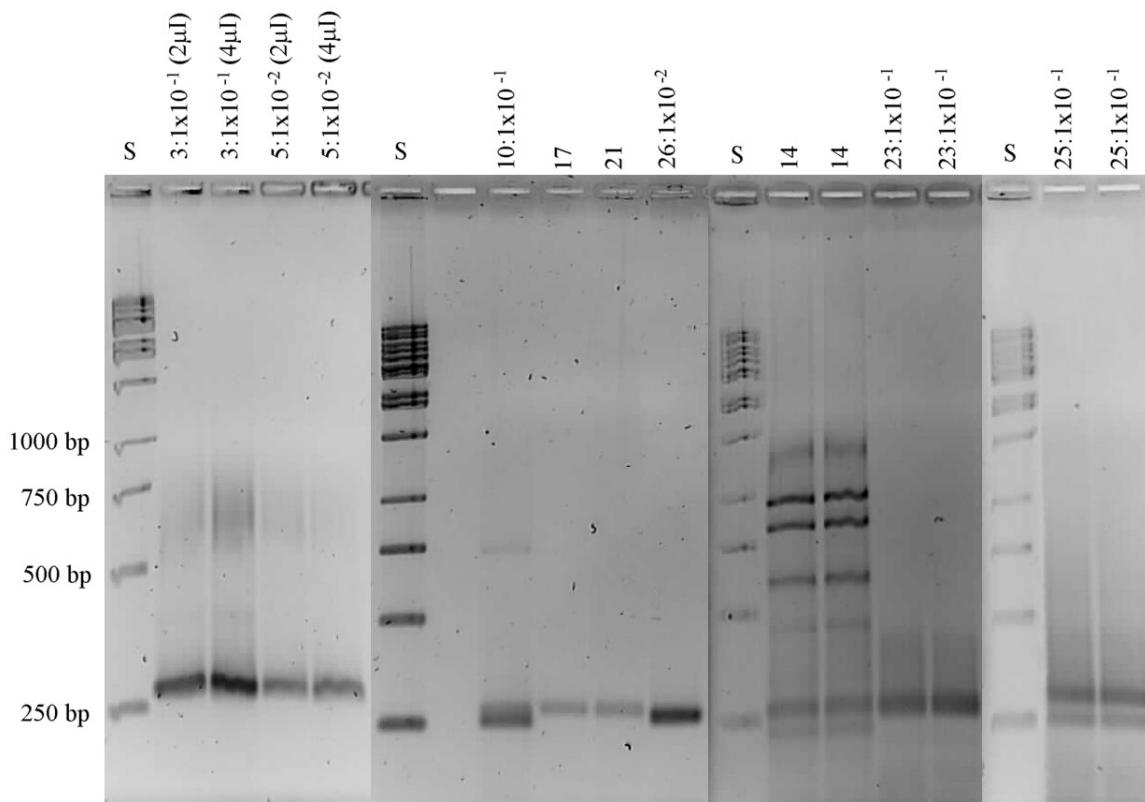
Ker se je uspešnost pomnoževanja klamidijskih 16S rRNK genov z začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst razlikovala med različnimi vzorci, smo osnovni PCR protokol 1 (Preglednica 4) optimizirali za posamezne vzorce. Pri

tem smo naredili PCR z gradientom temperature ($58,0^{\circ}\text{C}$, $61,0^{\circ}\text{C}$, $63,0^{\circ}\text{C}$, $65,2^{\circ}\text{C}$, $66,6^{\circ}\text{C}$ in $69,0^{\circ}\text{C}$) in ločeno z gradientom koncentracije MgCl_2 (2,5 mM, 2,0 mM, 1,75 mM, 1,5 mM in 1,25 mM). Za končno pomnoževanje tarčnih odsekov klamidijskih 16S rDNK po optimiziranem PCR protokolu 1 smo pripravili 50 μl reakcijske mešanice, za katere smo količine sestavin ustrezno prilagodili glede na 20 μl reakcije. Izjema je volumen vzorcev osamljenih nukleinskih kislin, ki smo jih dodali po 1 μl .

PCR pomnožke smo očistili s kompletom za čiščenje PCR pomnožkov 'High Pure PCR Product Purification Kit' (Roche, Mannheim, Nemčija) po navodilih proizvajalca.

Preglednica 8: Optimiziran PCR protokol 1

Vzorci	3, 5, 17, 21, 26	25	14, 23
Začetna oligonukleotida	Chl_16S(270)fpst Chl_16S(530)rpst	Chl_16S(270)fpst Chl_16S(530)rpst	Chl_16S(270)fpst Chl_16S(530)rpst
Koncentracija MgCl_2 (mM)	1,5	1,75	2,0
Začetna denaturacija 94°C (s)	180	180	180
Število ciklov	35	35	35
Denaturacija 94°C (s)	30	30	30
Prileganje T/t ($^{\circ}\text{C}/\text{s}$)	65/40	64/40	63/40
Polimerizacija 72°C (s)	30	30	30
Podaljšana polimerizacija 72°C (s)	600	600	600

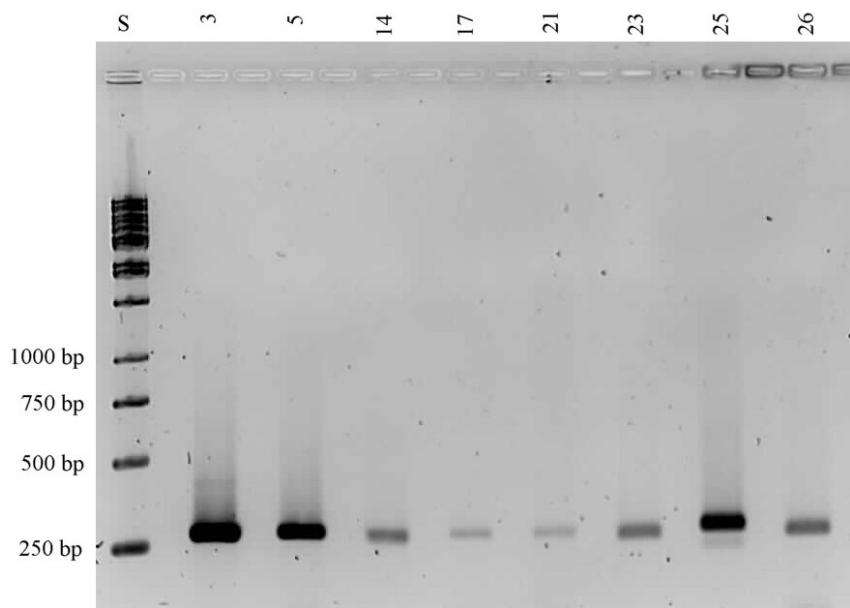


Slika 8: Na 1,5% agarozni gel naneseni s PCR s klamidijskima začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst pomnoženi deli genov za 16S rRNK vseh uspešno pomnoženih vzorcev. S – velikostni standard 1kb 'O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder' (Fermentas). Vrednosti za dvopičjem predstavljajo redčitev vzorca osamljenih nukleinskih kislin. Uporabljeni PCR protokoli za posamezne vzorce so navedeni v preglednici 8.

Opomba: slika je sestavljena iz večih gelov. Ker je vsak gel neponovljiv, se tudi hitrost potovanja pomnožkov med geli razlikuje.

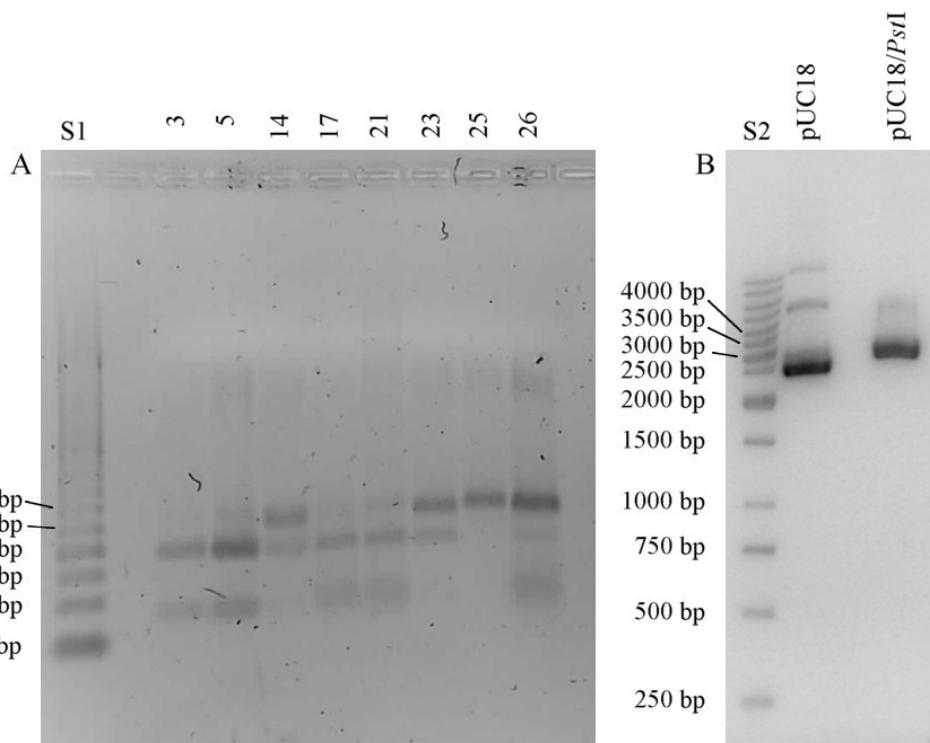
4.3 Kloniranje klamidijskih pomnožkov

Očiščene PCR pomnožke, pridobljene z začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst, smo elektroforetsko ločili v 1,5-odstotnem agaroznem gelu. Pri vzorcih, kjer so v verižni reakciji s polimerazo nastali tudi nespecifični pomnožki, smo proge ustrezne velikosti (260 bp) izrezali iz gela in jih osamili s kompletom za elucijo nukleinskih kislin iz agaroznega gela (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Frankfurt, Nemčija).



Slika 9: Na 1,5% agarozni gel naneseni očiščeni, s klamidijskima začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst pomnoženi deli genov za 16S rRNK vseh uspešno pomnoženih vzorcev. S – velikostni standard 1kb 'O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder' (Fermentas).

Opomba: vzorca 3 in 25 je bilo potrebno ponovno izrezati iz gela in čistiti s kompletom za elucijo nukleinskih kislin iz agaroznega gela (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN).



Slika 10: A) Na 1,5% agarozni gel naneseni s PCR z začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst pomnoženi deli genov za 16S rRNK, ki smo jih rezali z restriktivno endonukleazo *PstI*. S1 – velikostni standard 50bp 'GeneRuler™ 50bp DNA Ladder' (Fermentas). B) Na 1% agarozni gel nanešen izoliran plazmid pUC18 in pUC18 rezan z restriktivno endonukleazo *PstI*. S2 – velikostni standard 1kb 'O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder' (Fermentas).

Očiščene pomnožke in plazmidni vektor pUC18 smo rezali z restriktijsko endonukleazo *PstI* (podpoglavlje 3.2.6.3). Po končani restrikciji smo učinkovitost reakcije preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

S slike 10 je razvidno, da je, v nasprotju s pričakovanji, pri večini vzorcev prišlo tudi do restrikcije znotraj sekvene klamidijskih 16S rDNK pomnožkov in ne le v sekvenah začetnih oligonukleotidov. Z izjemo vzorca 25 sta pri vseh ostalih vzorcih vidna dva produkta restrikcije, dolga približno 200 bp in 80-100 bp. Pogostost tarčne sekvene (5' – CTGCAG – 3') za *PstI* znotraj reda *Chlamydiales* smo naknadno preverili v spletni bazi podatkov 'Ribosomal Database Project II' z orodjem 'Probe match'. Iskanje smo omejili od mesta 270 do 530, glede na označevanje 16S rDNK pri *E. coli*. V analizo smo vključili le sekvene, dolge vsaj 1200 nukleotidov, tj. 101778 bakterijskih 16S ribosomskih sekven na dan 24.9.2006.

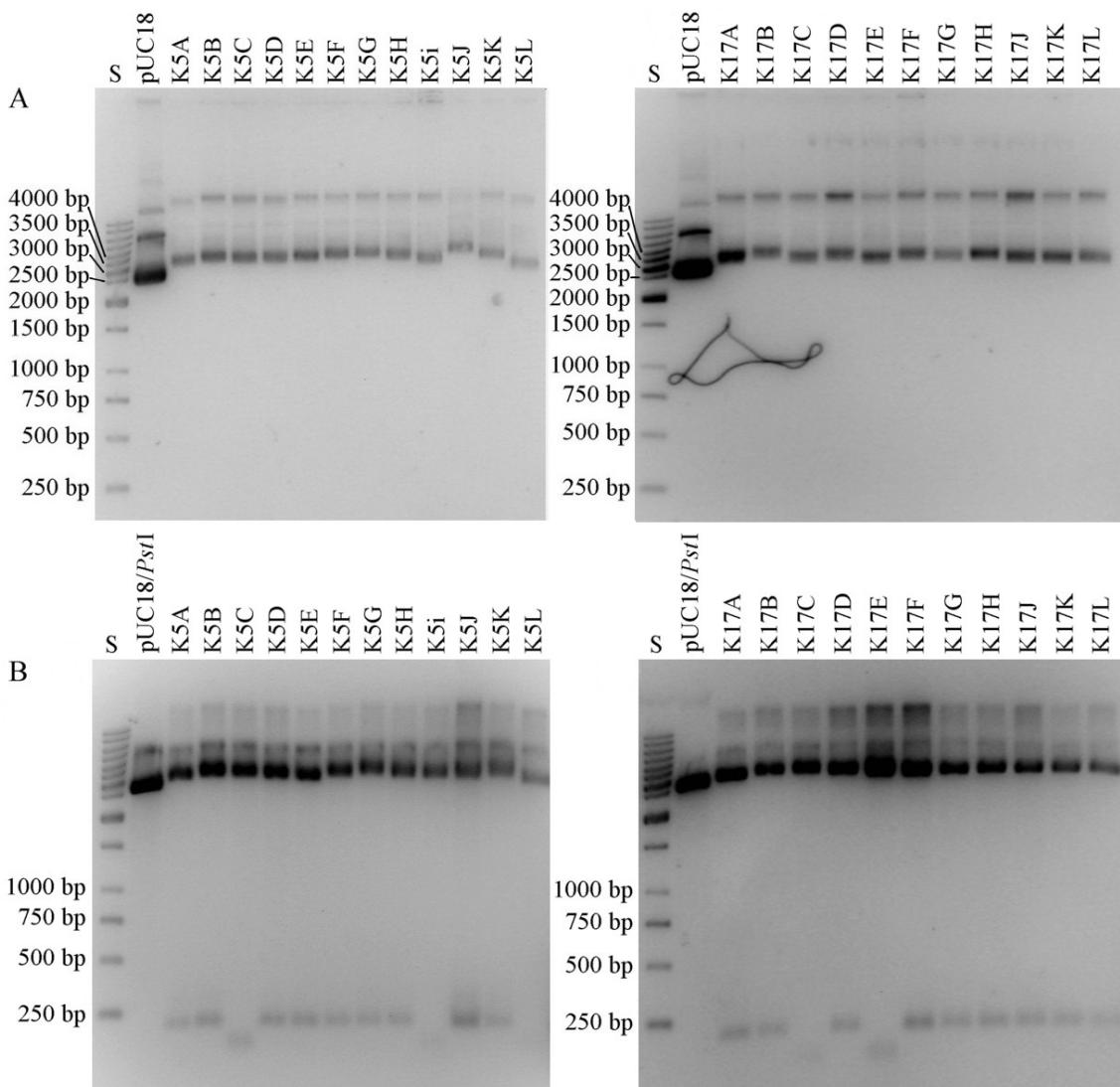
Preglednica 9: Pogostost tarčne sekvene za *PstI* znotraj bakterijskih debel z največ zadetki

Debelo (<i>phylum</i>)	Zadetki/vse sekvene	Pogostost znotraj debla (%)
<i>Chlamydiae</i>	171/174	98,3
<i>Planctomycetes</i>	778/796	97,7
<i>Actinobacteria</i>	8095/10176	79,5
<i>Lentisphaerae</i>	31/31	100,0
<i>Dictyoglomi</i>	4/4	100,0
vsa debla	28012/101778	27,5

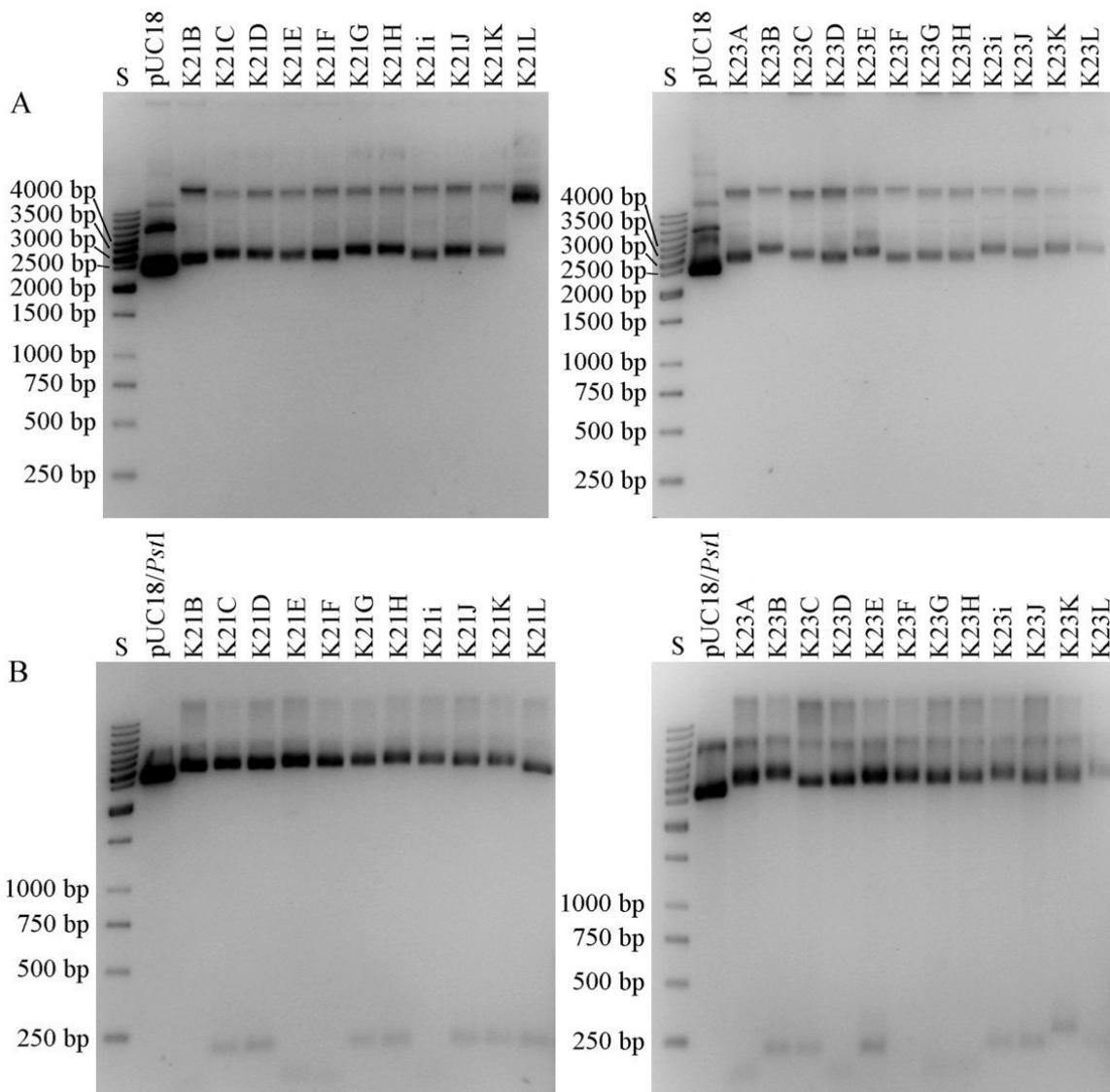
Z restriktijsko endonukleazo *PstI* rezane sekvene smo z ligacijo vstavili v plazmid pUC18 (podpoglavlje 3.2.6.3). Ustrezne alikvote ligacijskih mešanic smo transformirali v *E. coli* sev TOP10 po postopku, opisanem v podpoglavlju 3.2.6.2. Iz skupno 76 naključno izbranih klonov, transformiranih *E. coli* TOP10, smo s kompletom 'High Pure Plasmid Isolation Kit' (Roche, Mannheim, Nemčija) izolirali plazmidno DNK. Izolirano plazmidno DNK smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo v 1-odstotnem gelu.

4.3.1 Restriktijska analiza izolirane plazmidne DNK

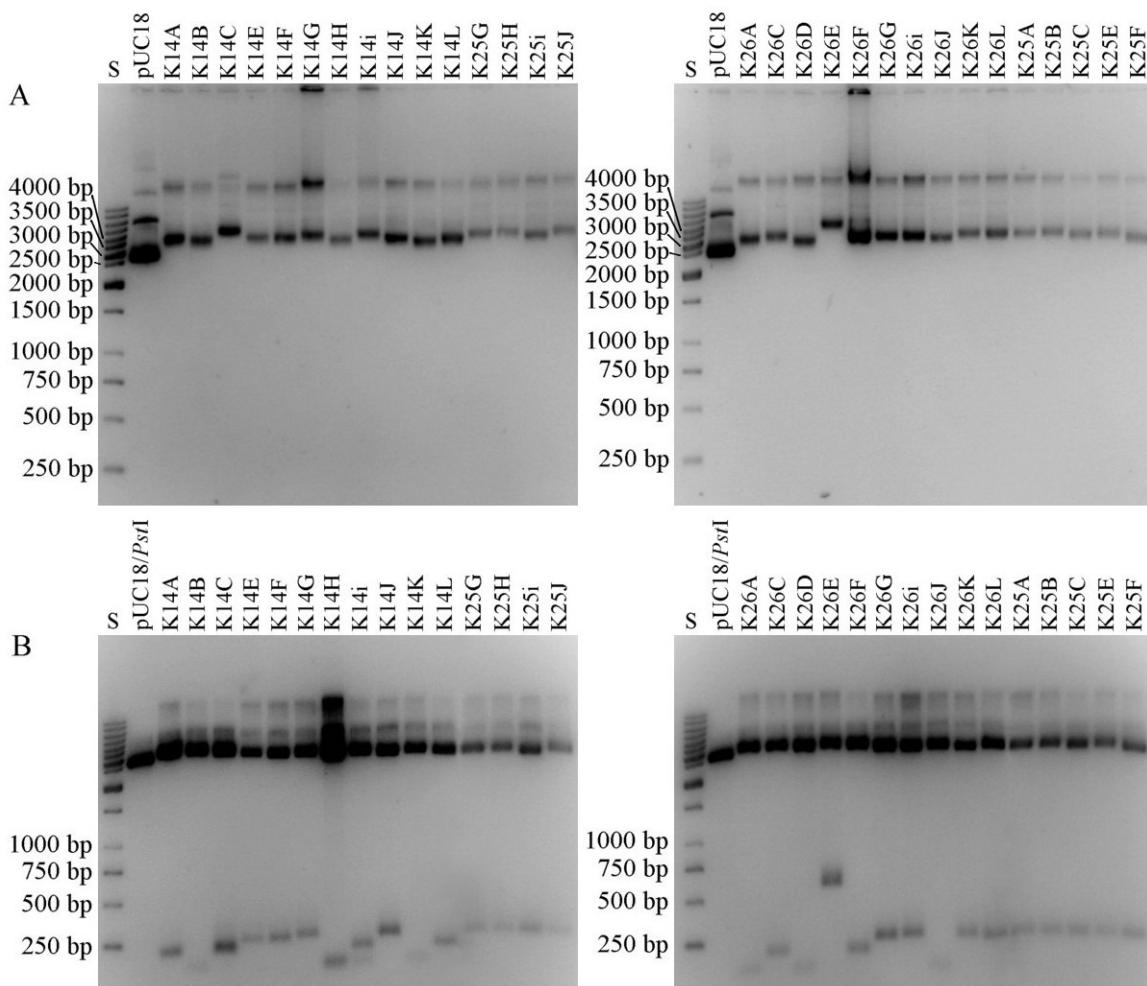
Da bi ugotovili, kakšni pomnožki so se vstavili v plazmide, smo izolirano plazmidno DNA vseh klonov rezali z restriktijsko endonukleazo *PstI* (podpogavje 3.2.6.4). Nastale produkte smo elektroforetsko ločili v 1,5-odstotnem agaroznem gelu (Slike 11, 12 in 13). Pri klonih nekaterih vzorcev smo opazili precejšnjo heterogenost v dolžini kloniranih pomnožkov 16S rRNA genov, zlasti to velja za klone vzorcev 14, 23 in 26. Pričakovali smo namreč zgolj pomnožke dveh dolžin, tj. približno 200 bp in 80 do 100 bp (Slika 10).



Slika 11: **A)** Elektroforetska ločitev plazmidne DNA klonov iz vzorcev 5 in 17 v 1% agaroznem gelu. **B)** Elektroforetska ločitev rezanih plazmidnih DNA klonov iz vzorcev 5 in 17 v 1,5% agaroznem gelu. S – velikostni standard 1 kb 'O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder' (Fermentas).



Slika 12: A) Elektroforetska ločitev plazmidne DNK klonov iz vzorcev 21 in 23 v 1% agaroznem gelu. B) Elektroforetska ločitev s *PstI* rezane plazmidne DNK klonov iz vzorcev 21 in 23 v 1,5% agaroznem gelu. S – velikostni standard 1 kb 'O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder' (Fermentas).



Slika 13: A) Elektroforetska ločitev plazmidne DNK klonov iz vzorcev 14, 25 in 26 v 1% agaroznem gelu. B) Elektroforetska ločitev s *Pst*I rezane plazmidne DNK klonov iz vzorcev 14, 25 in 26 v 1,5% agaroznem gelu. S – velikostni standard 1 kb 'O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder' (Fermentas).

4.4 Sekvenciranje in analiza sekvenč

Na podlagi restriktijske analize plazmidne DNK smo izbrali 20 klonov, pri čemer smo za vsak vzorec izbrali klone, pri katerih so se v plazmid vstavljeni pomnožki genov za 16S rRNK med seboj razlikovali po dolžini. Tako smo za vzorec 5 izbrali tri klone (K5C, K5D in K5J), za vzorec 14 šest klonov (K14A, K14B, K14C, K14G, K14i in K14J), za vzorec 17 dva klona (K17E in K17F), za vzorec 21 prav tako dva klona (K21D in K21E), za vzorec 23 tri klone (K23D, K23E in K23K), za vzorec 25 klon K25i ter za vzorec 26 tri klone (K26D, K26F in K26G). Vstavke s pomnožki delov genov za 16S rRNK so sekvencirali v podjetju Microsynth AG (Baglach, Švica).

Preglednica 10: Sekvence delov genov za 16S rRNK v FASTA obliki. Podprtana so zaporedja prileganja začetnih oligonukleotidov oz. restrikcijske endonukleaze *PstI*.

>K5C

CTGCAGGACGTCAAGGCAGGGCTGAGAGATTGACCGCCAACATTGGGACTGAGACACTGCCAAA
CTCCTACGGGAGGGCTGCAG

Dolžina: 55 nt

Delež GC: 58,2%

>K5J

CTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGAAAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTGAGTGATGAA
GGCTTCGGGTTGTATAACTCTTCGCGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTGAATAACTGATGCATAT
GAAAGTACTGCGTAAAGAACGACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACCTGCAG

Dolžina: 166 nt

Delež GC: 48,8%

>K14J

CTGCAGGACGTCTGGCGAGCTGAGAGGGTGGACGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGACACAATGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCG
CGTGAAGGAAGAAGTGTCTCGGTATGTAAACTTCTATCAGCAGGGAAAGAAAGTGGCTTCGGCCA
TATGACGGTACCTGACTAAGAACGACCCGGCTAATTACGTGCCAGCCGCTGCGGTAATACCTGCA
G

Dolžina: 206 nt

Delež GC: 56,8%

>K17F

CTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGAAAGCCTGACGAATCGACGCTGCGTGAGTGATGAA
GGCTTCGGGTTGTAAAACCTCTTCGCGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTGAATAACTGATGCATAT
GAGAGTACTGCGTAAAGAACGACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACCTGCAG

Dolžina: 162 nt

Delež GC: 48,1%

>K21D

CTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGAAAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTGAGTGATGAA
GGCTTCGGGTTGTAAAACCTCTTCGCGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTGAATAACTGACGCATAT
GAGAGTACTGCGTAAAGAACGACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACCTGCAG

Dolžina: 162 nt

Delež GC: 49,4%

>K23E

TGAGTGATGAAGGCTTCGGGTTGTTAAACTCTTCGCGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTGAACAA
CTGAATCATGTGAGAGTACTGCGTAAAGAACGACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCTGCGG
TAATTCCCTGCAG

Dolžina: 117 nt

Delež GC: 47,0%

>K23K

CTGCAGGACGTCTAGGCGGGTTGAGAGGGTGGACGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGACACAATGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCG
CGTGAAGGAAGAAGTGTCTCGGTATGTAAACTTCTATCAGCAGGGAAAGAAAGTGGCTTCGGCCA
TATGACGGTACCTGACTAAGAACGACCCGGCTAATTACGTGCCAGCCGCGCGTAATACCTGCA
G

Dolžina: 206 nt

Delež GC: 56,3%

Opomba: dolžina sekvenčne ne vključuje začetnih oligonukleotidov in ustreznega dela tarčnega zaporedja *PstI*.

Kromatograme sekvenčnih reakcij smo pregledali s programskim orodjem FinchTV (Geospiza Inc., ZDA). Od 20 klonov so bili kromatogrami čitljivi zgolj pri 7 primerih. V uporabnih sekvencah smo poiskali zaporedja začetnih oligonukleotidov Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst oz. tarčno zaporedje restriktivne endonukleaze *PstI* na 3' in 5' koncu ter odstranili sekvence, ki so pripadale plazmidu pUC18.

Sekvencam smo poiskali najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmom BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) in FASTA3 (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/index.html>).

Preglednica 11: Seznam najpodobnejših sekvenc v bazah podatkov, pridobljenih z BlastN

Klon	Najpodobnejše sekvence v bazah podatkov	Odstotek podobnosti	Dolžina primerjanih zaporedij
K5C	<i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> (AY223862)	96	76
	<i>Rhabdochlamydia crassificans</i> strain CRIB01 (AY928092)	96	76
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone P-12</i> (AF364578)	94	76
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone P-11</i> (AF364577)	94	76
K5J	<i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> (AY223862)	96	185
	<i>Rhabdochlamydia crassificans</i> strain CRIB01 (AY928092)	98/100	94/52
	<i>Chlamydia sp. CH301104</i> (DQ011662)	94/100	91/45
	<i>Criblamydia sequanensis</i> (DQ124300)	94/100	91/45
	<i>Endosymbiont of Acanthamoeba sp.</i> UWC22 (AF083616)	94/100	91/45
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone P-12</i> (AF364578)	93/100	91/45
K14J	<i>Uncultured bacterium clone 29c-d9</i> (DQ905902)	99/94	159/58
	<i>Uncultured bacterium clone CFT212F10</i> (DQ456379)	99/94	159/58
	<i>Uncultured bacterium clone gr4_i28_4</i> (AY237198)	99/94	159/58
	<i>Uncultured bacterium clone BREC_23</i> (AY338323)	99/94	159/58
K17F	<i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> (AY223862)	96	185
	<i>Rhabdochlamydia crassificans</i> strain CRIB01 (AY928092)	98/100	94/52
	<i>Chlamydia sp. CH301104</i> (DQ011662)	94/100	91/45
	<i>Criblamydia sequanensis</i> (DQ124300)	94/100	91/45
	<i>Endosymbiont of Acanthamoeba sp.</i> UWC22 (AF083616)	94/100	91/45
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone P-12</i> (AF364578)	93/100	91/45
K21D	<i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> (AY223862)	96	185
	<i>Rhabdochlamydia crassificans</i> strain CRIB01 (AY928092)	100/98	94/52
	<i>Chlamydia sp. CH301104</i> (DQ011662)	95/97	91/45
	<i>Criblamydia sequanensis</i> (DQ124300)	95/97	91/45
	<i>Endosymbiont of Acanthamoeba sp.</i> UWC22 (AF083616)	95/97	91/45
	<i>Uncultured Chlamydiales bacterium clone P-12</i> (AF364578)	94/97	91/45
K23E	<i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> (AY223862)	95	121
	<i>Rhabdochlamydia crassificans</i> strain CRIB01 (AY928092)	100/97	41/41
K23K	<i>Uncultured bacterium clone 29c-d9</i> (DQ905902)	99/96	158/58
	<i>Uncultured bacterium clone CFT212F10</i> (DQ456379)	99/94	158/58
	<i>Uncultured bacterium clone CFT212A8</i> (DQ456327)	99/96	158/57
	<i>Uncultured bacterium clone gr4_i28_4</i> (AY237198)	99/96	158/58

Preglednica 12: Seznam najpodobnejših sekvenčnih sekvenc v bazah podatkov, pridobljenih s Fasta3

Klon	Najpodobnejše sekvenčne sekvence v bazah podatkov	Odstotek podobnosti	Dolžina primerjanih zaporedij
K5C	<i>Rhabdochlamydia crassificans</i> strain CRIB01 (AY928092)	96,104	77
	<i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> (AY223862)	96,104	77
	<i>Simkania negevensis</i> 16S and 23S (U68460)	94,805	77
	<i>Chlamydophila pneumoniae</i> TW-183 (AE017160)	93,506	77
	<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CWL029 (AE001363)	93,506	77
	Sequence 1 from patent US 6822071 (AR607478)	93,506	77
K5J	<i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> (AY223862)	96,216	185
	<i>Rhabdochlamydia crassificans</i> strain CRIB01 (AY928092)	88,542	192
	Endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. UWC22 (AF083616)	83,784	185
	<i>Chlamydia</i> sp. CH301104 (DQ011662)	83,243	185
	Endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. UWE1 (AF083614)	82,703	185
	<i>Criblamydia sequanensis</i> (DQ124300)	82,703	185
	Sequence 1 from patent US 6822071 (AR607478)	82,162	185
K14J	<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CWL029 (AE001363)	82,162	185
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> Bu 43 (X89976)	88,571	245
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> isolate M55 (AY699273)	87,755	245
	<i>Butyrivibrio hungatei</i> strain Su6 (AY178635)	87,755	245
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> strain NCDO 2398 (X89972)	87,755	245
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> isolate L8 (AY699274)	87,347	245
K17F	<i>Butyrivibrio hungatei</i> strain JK 615 (AJ428553)	87,347	245
	<i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> (AY223862)	96,757	185
	<i>Rhabdochlamydia crassificans</i> strain CRIB01 (AY928092)	88,542	192
	Endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. UWC22 (AF083616)	84,324	185
	Endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. TUME1 (AF098330)	84,324	185
	<i>Chlamydia</i> sp. CH301104 (DQ011662)	83,784	185
	Endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. UWE1 (AF083614)	83,243	185
	<i>Criblamydia sequanensis</i> (DQ124300)	83,243	185
K21D	Sequence 1 from patent US 6822071 (AR607478)	82,703	185
	<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CWL029 (AE001363)	82,703	185
	<i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> (AY223862)	96,757	185
	<i>Rhabdochlamydia crassificans</i> strain CRIB01 (AY928092)	88,542	192
	Endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. UWC22 (AF083616)	84,324	185
	Endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. TUME1 (AF098330)	84,324	185
	<i>Neochlamydia hartmannellae</i> (AF177275)	83,871	186
K23E	Endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. UWE1 (AF083614)	83,784	185
	<i>Criblamydia sequanensis</i> (DQ124300)	83,243	185
	<i>Chlamydia</i> sp. CH301104 (DQ011662)	83,243	185
	<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CWL029 (AE001363)	82,162	185
	<i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> (AY223862)	92,593	135
K23K	<i>Rhabdochlamydia crassificans</i> strain CRIB01 (AY928092)	82,394	142
	Endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. TUME1 (AF098330)	79,259	135
	Endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. UWC22 (AF083616)	79,259	135
	<i>Simkania negevensis</i> 16S and 23S (U68460)	77,037	135
K23K	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> Bu 43 (X89976)	89,388	245
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> isolate M55 (AY699273)	88,571	245
	<i>Butyrivibrio hungatei</i> strain Su6 (AY178635)	88,571	245
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> strain NCDO 2398 (X89972)	88,571	245
	<i>Clostridium jejuniense</i> (AY494606)	89,540	239
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> isolate L8 (AY699274)	88,163	245

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Nevretenčarski gostitelji

Odkrivanje klamidijskih endosimbiotov v nevretenčarjih so spodbudili izsledki raziskav, ki kažejo, da ta izredno pesta, številčna in razširjena skupina živali morda predstavlja velik naravni rezervoar bakterij iz reda *Chlamydiales*. Poleg spoznavanja vrstne in genetske pestrosti klamidij ter obsega njihovih gostiteljev so tovrstne raziskave pomembne tudi z medicinskega vidika. Človek namreč pogosto prihaja, neposredno ali posredno, v stik z nevretenčarji, zlasti členonožci, in s tem potencialno tudi s klamidijami. Čeprav so do sedaj opisane klamidije v členonožcih (kandidatna rodova *Rhabdochlamydia* in *Fritschea*) domnevno specializirane le na svoje gostitelje, pa možnosti okužbe človeka in drugih vretenčarjev ne moremo izključiti. Po priporočilih je namreč potrebno vse klamidije obravnavati kot možne patogene vretenčarjev (Corsaro in sod., 2004). Na to opozarjajo tudi iz kliničnih vzorcev pridobljene sekvene klamidijskih genov za 16S rRNK, ki jih na podlagi primerjalne analize sekvenc 16S rDNK uvrščamo med sorodnike bakterij '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' (klamidijska klena CRG95 in CRG96) oz. v razširjeno taksonomsko skupino '*Simkaniaceae* - '*Candidatus R. porcellionis*' (kloni CRG26, CRG32, CRG74, CRG79 in CRG81) (Corsaro in sod., 2004).

5.1.2 Pomnoževanje delov klamidijskih 16S rRNK genov z verižno reakcijo s polimerazo

Pomnoževanje odsekov klamidijskih genov za 16S rRNK, daljših od 1000 bp, se je izkazalo za zelo težavno in nepredvidljivo, ne glede na uporabljeni par začetnih oligonukleotidov (Preglednica 7, podpoglavlje 4.2). Tako so kljub poskusom optimizacije PCR protokolov nastajali številni nespecifični pomnožki, pri določenih vzorcih pa tarčnih sekvenc niti nismo uspeli pomnožiti. Vzrok za nastajanje nespecifičnih produktov lahko delno pripišemo degeneriranosti začetnih oligonukleotidov, zlasti Chl_16S(270)f, ki smo ga največkrat uporabili kot proti 3' obrnjen začetni oligonukleotid v paru z različnimi proti

5' obrnjenimi začetnimi oligonukleotidi (Preglednica 4, podpoglavlje 3.2.3). Zato smo za pomnoževanje klamidijskih 16S rDNK zaporedij uporabili par začetnih oligonukleotidov Chl_16S(270)f in Chl_16S(530)r, ki smo ga prvotno uporabljali za preverjanje prisotnosti klamidijskih 16S rDNK sekvenč v vzorcih osamljene DNK. S tem parom začetnih oligonukleotidov smo uspešno pomnožili tarčne sekvenčne pri osmih od enajstih izbranih vzorcev. Jerca Mraz je z istim parom začetnih oligonukleotidov uspela pomnožiti tarčne odseke genov za 16S rRNK pri vseh vzorcih, ki smo jih uporabili v naših poskusih. Izbor vzorcev za naše poskuse je temeljil ravno na rezultatih uspešne pomnožitve odsekov genov za 16S rRNK pri teh vzorcih (Mraz, 2006). Vendar so v predhodnih poskusih uspešno klonirali le pomnožke delov bakterijske 16S rDNK v vzorcih nukleinskih kislin, osamljenih iz zadka pajka *Dysdera ninnii* (Mraz, 2006). Sekvenciranje in sekvenčna analiza sta pokazala, da klonirane sekvenčne pripadajo redu *Chlamydiales*. Ker pomnožkov genov za 16S rRNK, pridobljenih iz vzorcev nukleinskih kislin, osamljenih iz drugih nevretenčarjev, niso klonirali in sekvencirali, je nemogoče vedeti, ali so ti pomnožki genov za 16S rRNK dejansko klamidijski. Dodatne dvome vzbuja tudi dejstvo, da je bila temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov relativno nizka, zgolj 56°C, in da sta oba začetna oligonukleotida večkrat degenerirana (Mraz, 2006). Dvomljivo specifičnost pomnoževanja klamidijskih genov za 16S rRNK z začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)f in Chl_16S(530)r nakazujejo tudi rezultati analize sekvenč, pridobljenih v naših poskusih (podpoglavlje 5.1.4).

Razlogov za neuspešno pomnoževanje odsekov klamidijskih genov za 16S rRNK pri vzorcih 18, 25 in 31 je lahko več. Pogost problem pri pomnoževanju tarčnih sekvenč v reakciji pomnoževanja s polimerazo DNK, kjer kot matriko uporabimo nukleinske kisline, osamljene iz okoljskih vzorcev, predstavlja prisotnost snovi, ki inhibirajo delovanje *Taq* polimeraze. Vendar se v našem primeru to zdi malo verjetno, saj redčenje izvornih vzorcev osamljenih nukleinskih kislin in s tem možnih inhibitornih snovi ni imelo vpliva na uspešnost pomnoževanja tarčnih sekvenč pri omenjenih treh vzorcih. Možen vzrok je tudi slaba kakovost osamljenih nukleinskih kislin, ki je lahko posledica mnogokratnega tajanja in zamrzovanja vzorcev osamljenih nukleinskih kislin ali kontaminacije z restriktijskimi eksonukleazami DNK. Seveda obstaja tudi možnost, da klamidijskih nukleinskih kislin v

vzorcih sploh ni bilo oz. je število molekul tarčnih nukleinskih kislin pod mejo zaznavanja z verižno reakcijo s polimerazo.

Za usmerjeno kloniranje pomnožkov v plazmidni vektor pUC18 smo začetna oligonukleotida Chl_16S(270)f in Chl_16S(530)r spremenili tako, da smo dodali kratko sekvenco, ki smo jo v toku sinteze oligonukleotida sintetizirali na 5' koncu oligonukleotida in je vsebovala tarčno mesto za restriktivno endonukleazo *PstI* ter izvedli verižno reakcijo s polimerazo za vse vzorce. S spremenjenima začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst smo uspešno pomnožili odsek gena za 16S rRNK tudi pri vzorcu 25, česar z izvornima začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)f in Chl_16S(530)r nismo uspeli. Pregled agaroznih gelov, ki smo jih barvali z barvilo SYBR Gold, je razkril, da pri več vzorcih poleg tarčnih pomnožkov nastajajo tudi nespecifični pomnožki različnih velikosti. SYBR Gold je mnogo občutljivejše barvilo kot etidijev bromid in zato omogoča zaznavanje manjših količin DNK. Ker specifičnost reakcije pomnoževanja s polimerazo narašča z višanjem temperature prileganja začetnih oligonukleotidov in nižanjem koncentracije MgCl₂, smo izvedli optimizacijo PCR protokola z gradientom temperature in koncentracije MgCl₂ (pod poglavje 4.2.1). Zaradi razlik v uspešnosti pomnoževanja tarčnih sekvenc pri različnih vzorcih osamljenih DNK smo PCR protokol prilagodili posameznim vzorcem (Preglednica 8). Kljub številnim poskusom in ponovitvam pa pri nekaterih vzorcih nismo uspeli odpraviti nastajanja nespecifičnih pomnožkov. Zato smo pomnožke pri teh vzorcih elektroforetsko ločili v agaroznem gelu, pomnožke prave velikosti izrezali iz gela ter jih osamili iz gela s kompletom za čiščenje nukleinskih kislin iz agaroznega gela. Izjema je bil vzorec 10, pri katerem se nespecifični pomnožek elektroforetsko ni zadost ločil od specifičnega in ga posledično nismo mogli učinkovito izrezati iz agaroznega gela (Slika 8).

Rezultati analize specifičnosti začetnih oligonukleotidov nakazujejo, da pomnoževanje nespecifičnih pomnožkov verjetno ni posledica specifičnosti začetnih oligonukleotidov Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst (Preglednica 6). Zlasti Chl_16S(270)fpst je domnevno zelo specifičen za red *Chlamydiales*, saj z dvema dovoljenima napakama prilega na zgolj 19 neklamidijskih sekvenc genov za 16S rRNK v bazi podatkov RDP II. Seveda je bilo ugotavljanje specifičnosti začetnih oligonukleotidov v našem primeru

omejeno z naborom sekvenc, deponiranih v bazi podatkov RDP II, ki vsekakor predstavljajo le delež različnih bakterijskih okoljskih sekvenc, deponiranih v splošnih bazah podatkov, kot sta 'GenBank' in 'EMBL Nucleotide Database'. Tako ne moremo izključiti možnosti, da je dejanska specifičnost začetnih oligonukleotidov slabša, kot pa to nakazujejo rezultati naše analize. Možen vzrok za nastajanje nespecifičnih pomnožkov je tudi prenizka temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov. Vendar smo med optimizacijo PCR protokola ugotovili, da pri višjih temperaturah prileganja začetnih oligonukleotidov bodisi nastane premalo pomnožkov ali pa pomnožkov v agaroznih gelih sploh ni bilo zaznati. Tako so optimizirani protokoli, navedeni v preglednici 8, dejansko kompromis med specifičnostjo in zadostno količino pomnožkov.

5.1.3 Kloniranje in analiza klonov

Za izvedbo ligacije pomnožkov, pridobljenih s parom začetnih oligonukleotidov Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst, v plazmidni vektor pUC18 smo morali tako pomnožke kot vektor predhodno rezati z restrikcijsko endonukleazo *PstI*. Pregled agaroznega gela, v katerem smo elektroforetsko ločili nastale restrikcijske produkte, je pokazal, da je pri večini vzorcev prišlo do restrikcije tudi znotraj klamidijskih sekvenc in ne le v sekvencah začetnih oligonukleotidov (Slika 10). Vidna sta bila dva produkta restrikcije dolžin približno 200 bp in približno 80 bp. Izjema je bil le vzorec 25, pri katerem do restrikcije znotraj sekvence pomnožka gena za 16S rRNA ni prišlo. To je bilo svojevrstno presenečenje, saj je *PstI* eden najpogosteje uporabljenih encimov pri pripravi PCR pomnožkov ribosomskih genov za usmerjeno kloniranje v plazmidne vektorje. Zato smo naknadno pogostost tarčnih sekvenc za *PstI* v redu *Chlamydiales* preverili v spletni bazi podatkov 'Ribosomal Database Project II' z orodjem 'Probe match'. Izkazalo se je, da ravno klamidije predstavljajo eno izmed redkih skupin bakterij, kjer se tarčna sekvenca za *PstI* pogosto pojavlja v genu za 16S rRNA med mestoma 270 in 530, saj je prisotna v kar 98,3% klamidijskih sekvenc, daljših od 1200 bp, objavljenih v bazi podatkov RDP II (Preglednica 9).

Pri pripravi ligacijskih mešanic smo pazili, da je molsko razmerje med pomnožki in plazmidom približno 1:1. Če se molsko razmerje prevesi v prid vključka, se namreč močno poveča možnost, da se v en plazmid vstavi več pomnožkov. V našem primeru to sicer ni bilo ključnega pomena, saj za sekvencijski začetni oligonukleotid nismo izbrali Chl_16S(270)f ali Chl_16S(530)r, pač pa standardni sekvencijski začetni oligonukleotid M13r, ki prilega na sekvenco, ki je del plazmida pUC18. Tako smo ob pregledu sekvenc lahko enostavno ločili posamezne sekvence glede na značilne sekvence začetnih oligonukleotidov oziroma tarčno sekvenco za *PstI*.

Plazmide z vstavljenimi pomnožki genov za 16S rRNK smo transformirali v kompetentne celice *E. coli* TOP10 in transformacijske mešanice enakomerno razmazali na selektivna trdna gojišča LB z antibiotikom ampicilinom in kromogenim analogom lakteze 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopyranozidom. Pri selekciji klonov smo pazili, da smo plošče pregledali in precepili naključno izbrane bele kolonije prej kot po 16 urah inkubacije pri 37°C. Sčasoma namreč koncentracija ampicilina v koncentričnih conah okoli kolonij transformiranih celic upada, kar po približno 16 urah omogoči rast tudi netransformiranim celicam, ki tvorijo ti. satelitne kolonije v bližini kolonij transformiranih celic. Če pregledujemo plošče po več kot 16 urah inkubacije pri 37°C, ne moremo zanesljivo ločiti belih kolonij, ki jih tvorijo celice, transformirane z vključkom v plazmidu od satelitnih kolonij netransformiranih celic.

Da bi ugotovili kakšni pomnožki so se vstavili v plazmide, smo izolirano plazmidno DNK vseh izbranih klonov rezali z restrikcijsko endonukleazo *PstI*. Za celovitejšo restrikcijsko analizo z različnimi encimi se nismo odločili, saj smo na podlagi rezultatov preverjanja specifičnosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov predvidevali, da je možnost, da smo pomnožili neklamidijske 16S rDNK sekvence, zelo majhna. Tudi zaradi majhnosti pomnožkov je verjetnost, da bi v njih lahko našli informativno restrikcijsko mesto, majhna. Pregled agaroznih gelov, v katerih smo elektroforetsko ločili nastale restrikcijske produkte, je razkril, da so se pri večini vzorcev v plazmide vstavili krajevi, 80 bp dolgi, in daljši, 200 bp dolgi, vključki oz. nerezani, 260 bp dolgi, vključki pri klonih pomnožkov iz vzorca 25, kar smo tudi pričakovali glede na rezultate restrikcije s *PstI* za pripravo pomnožkov genov za 16S rRNK za ligacijo v pUC18. Izjema so bili kloni vzorcev 14, 23 in 26, pri katerih je

restrikcijska analiza pokazala, da so se v plazmide vstavili vključki različnih dolžin. Tako smo pri klonih vzorca 14 ločili pet različno dolgih vključkov, pri klonih vzorca 23 tri in pri klonih vzorca 26 štiri različno dolge vključke. Ti rezultati nakazujejo precejšnjo heterogenost z verižno reakcijo s polimerazo pomnoženih sekvenc genov za 16S rRNK pri nukleinskih kislinah, osamljenih iz vzorcev 14, 23 in 26. Razlike v dolžini s *PstI* rezanih vključkov so najverjetneje posledica različnih sekvenc genov za 16S rRNK, ki so bili prisotni v vzorcih osamljenih nukleinskih kislin in ki smo jih istočasno pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo in začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst. To morda pomeni, da so bile v istem nevretenčarskem vzorcu prisotne različne klamidije ali da sta začetna oligonukleotida prilegalna tudi na neklamidijske sekvenčne genove za 16S rRNK. Sekvenčna analiza potrjuje, da smo dejansko pomnožili tudi sekvenčne genove, ki najverjetneje niso klamidijske (K14J in K23K). Zanimivo je, da obe neklamidijski sekvenčni ne vsebujejo restrikcijskega mesta za *PstI* v odseku med sekvenčnimi začetnimi oligonukleotidom in da so bile vse uspešno sekvencirane klamidijske sekvenčne rezane s *PstI* tudi v odseku med sekvenčnimi začetnimi oligonukleotidom. Ker pa sekvenčni kromatogrami pri kar trinajstih vzorcih niso bili berljivi, ne moremo vedeti, ali so ostale sekvenčne, ki, po dolžini sodeč, niso vsebovale restrikcijskega mesta za *PstI* oz. so se po dolžini razlikovale od pričakovanih restrikcijskih produktov dolžin približno 200 bp in 80 bp, klamidijske ali neklamidijske in ali so v istem vzorcu morda res prisotne različne klamidijske sekvenčne 16S ribosomski genovi. Pri sekvenčnih genov za 16S rRNK, pomnoženih iz vzorca 23, opazimo, da smo poleg neklamidijske sekvenčne (K23K) pomnožili tudi klamidijsko (K23E), kar dodatno potrjuje domnevo, da smo vsaj pri nekaterih vzorcih osamljenih nukleinskih kislin pomnožili različne sekvenčne genove za 16S rRNK.

5.1.4 Sekvenciranje in analiza sekvenčne

Izbrali smo skupno dvajset klonov, pri čemer smo za vsak vzorec izbrali vse klone z vključki različnih dolžin in jih poslali sekvencirati. Od dvajsetih klonov so bili kromatogrami čitljivi pri zgolj sedmih. Kromatograme smo pregledali in ustrezno popravili sekvenčne. V vsaki sekvenčni smo poiskali sekvenčne začetnimi oligonukleotidom Chl_16S(270)fpst in/ali Chl_16S(530)rpst oziroma tarčne sekvenčne za *PstI*. Tako

pridobljenim sekvencam smo poiskali najpodobnejše sekvene v spletnih bazah podatkov. Za iskanje smo uporabili orodji BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) in FASTA3 (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/index.html>). Orodji uporabljata različna algoritma za poravnavo sekvenč in izračunavanje podobnosti. Tako BlastN deluje po načelu iskanja lokalnih podobnosti in pri izračunu podobnosti upošteva le primerjane odseke sekvenč. Večjih vrzeli, ki so posledica delecij ali insercij nukleotidov, in odsekov večjega neujemanja ne upošteva. FASTA primerja celotno sekvenco in pri izračunu podobnosti upošteva poleg nukleotidnih zamenjav tudi vse vrzeli (insercije ali delecije nukleotidov). Pri klonih K5C, K5J, K17F, K21D in K23E je primerjava z obema algoritmoma pokazala, da gre za sekvenč klamidijskih 16S ribosomskih genov. Pri vseh petih klonih je najpodobnejša sekvenca v bazah podatkov iz bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'. Sekvenca klena K5C kaže enako podobnost s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' in '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*'. Ker smo pomnožili zelo kratke sekvenčne genove za 16S rRNK, je neutemeljeno trditi, da so sekvenčne naših klonov filogenetsko bližje katerikoli izmed omenjenih klamidijskih, saj bi za zanesljivejšo primerjalno sekvenčno analizo morali pomnožiti mnogo daljše odseke genov za 16S rRNK. Daljša ko je sekvenca, večjo informativno vrednost ima. Vsekakor pa lahko trdimo, da so sekvenčne klonove K5C, K5J, K17F, K21D in K23E klamidijske. Izmed sekvenč vseh klamidijskih klonov najbolj izstopa K23E, saj vsebuje dodatne tri nukleotide, ki jih ne zasledimo v sekvenčih genov za 16S rRNK bakterij '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*', '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' niti klonov K5J, K17F in K21D (priloge F, H3, H5 in H6).

Čeprav smo dokazali prisotnost klamidijskih sekvenč v vzorcih 5 (zadek pajka *Dysdera ninnii*), 17 (hepatopankreas enakonožnega raka *Asellus aquaticus*), 21 (črevo stonoge *Julus sp.*) in 23 (črevo stonoge *Polydesmus sp.*), to še ni zadosten dokaz, da so te živali dejansko gostitelji klamidijskih endosimbiontov. Da bi dokazali, da klamidijske res okužujejo omenjene živali, bi morali tudi potrditi njihovo prisotnost v celicah teh živali, npr. z elektronsko mikroskopijo ali fluorescentno mikroskopijo in uporabo za te klamidijske specifčnih fluorescentnih lovki.

Iskanje najbolj podobnih sekvenc v bazah podatkov za klone K14J in K23K je dalo popolnoma nepričakovane rezultate. Klonoma K14J in K23K najpodobnejša sekvencia, pridobljena z iskalnim orodjem BlastN, pripada negojenemu bakterijskemu klonu 29c-d9, katerega sekvenco so pomnožili iz vzorca, pridobljenega iz debelega črevesa človeka. Po podobnosti sekvence gena za 16S rRNK je klon 29c-d9 najbolj podoben bakterijam iz rodu *Ruminococcus*, vendar gre za negojen organizem, ki je trenutno označen kot bakterija iz okoljskih vzorcev. Najbolj podobna sekvencia, pridobljena z iskalnim orodjem FASTA3, pa pripada bakteriji *Butyrivibrio fibrisolvens* Bu 43. Poravnavo sekvenc klonov K14J in K23K z najpodobnejšima sekvencama v bazah podatkov je razkrila veliko število neujemanj v odsekih, ki pripadata začetnima oligonukleotidoma (Priloge C in G). To morda nakazuje nespecifično prileganje uporabljenih začetnih oligonukleotidov. Pri poravnavi sekvenc klonov K14J in K23K s sekvenco bakterijskega klena 29c-d9 smo opazili, da kažejo sekvence visok odstotek podobnosti delov, ki ležijo v delu sekvenc med sekvencama začetnih oligonukleotidov, in sicer od mesta 23 do mesta 173 in od mesta 188 do 227 (označevanje glede na sekvenci K14J in K23K), medtem ko za vmesni del, mesta 174 do 187, kaže, da gre za vključek štirinajstih nukleotidov v sekvencah K14J in K23K (Prilogi C2 in G2). Poravnavi samih sekvenc K14J in K23K med seboj pa pokaže, da sta sekvenci v delu med sekvencama začetnih oligonukleotidov popolnoma identični (Priloga I). Sekvenci klonov K14J in K23K zaradi kratke dolžine ne moremo zanesljivo filogenetsko uvrstiti, najverjetneje pa nista klamidijski. Seveda obstaja tudi možnost, da sta sekvenci K14J in K23K vseeno klamidijski, vendar se v tem odseku močno razlikujeta od vseh do sedaj znanih sekvenc klamidijskih genov za 16S rRNK.

Dejstvo, da smo z začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst najverjetneje pomnožili tudi neklamidijske sekvence pri dveh vzorcih, nakazuje, da so uporabljeni par začetnih oligonukleotidov in PCR protokoli suboptimalni za pomnoževanje zgolj klamidijskih sekvenc genov za 16S rRNK (podpoglavlje 5.1.2, str. 42-43). Za zanesljivejše rezultate bi morali uporabiti začetne oligonukleotide, ki bi omogočili pomnožitev daljših odsekov klamidijskih genov za 16S rRNK (vsaj 1000 bp). Potrebno je poudariti, da so pomnoženih deli klamidijskih genov za 16S rRNK verjetno bolj informativni kot bi pričakovali zgolj glede na dolžino. Odseki genov za 16S rRNK od mesta 270 do 530 namreč vsebujejo del regije, ki je pri klamidijah zelo variabilna in se

označuje kot 'prepoznavna sekvenca' za klamidije, sega pa od mesta 40 do 337 (Everett in sod., 1999).

Vzroke za neuspešno sekvenciranje štirinajstih od dvajsetih klonov je težko najti. Vsekakor pa pregled sekvencijskih kromatogramov ponuja nekatere indice. Pri nekaterih sekvencijskih kromatogramih je opazen značilen močan signal na začetku (posledica prostih, v sekvencijski reakciji neporabljenih nukleotidov), ki mu sledi oster padec signala vseh štirih nukleotidov. To je indikator neuspele sekvencijske reakcije, ki je lahko posledica nizke koncentracije matrične DNK, slabe kakovosti matrične DNK ali odsotnosti sekvenc za prileganje začetnih oligonukleotidov. Lahko pa je to tudi posledica napake osebe, ki je izvajala reakcije, ali sekvencijske opreme (odsotnost kakšnega od reagentov, zračni mehurček v igli za vbrizgavanje, ...). Koncentracija plazmidne DNK v našem primeru ni vprašljiva, saj so raztopine plazmidne DNK vseh klonov vsebovale zadostne koncentracije DNK glede na zahteve izvajalca (Microsynth AG, Baglach, Švica). Tudi odsotnost sekvence prileganja začetnega oligonukleotida M13r se zdi malo verjetna, saj je ta sekvencia integralni del plazmida pUC18. Kakšna je bila kakovost DNK, ko so sekvencijske reakcije dejansko potekale, je nemogoče vedeti. Vsekakor pa bi močno fragmentacijo plazmidne DNK naših klonov opazili kot izrazite razvlečene lise ob pregledu agaroznih gelov, v katerih smo elektroforetsko ločili izolirano plazmidno DNK. Tega nismo opazili, saj so na slikah agaroznih gelov dobro vidni ostri pasovi, ki jih tvori plazmidna DNK (Slika 11A, 12A in 13A). Vsaj pri enem kromatogramu smo opazili izrazit signal vseh štirih nukleotidov na istem mestu, kar pomeni, da je bil med migracijo v elektroforetski kapilari prisoten zračni mehurček ali trdni delec, kar je povzročilo razpršitev laserskega žarka in posledično značilen signal. Kromatogrami določenih vzorcev nakazujejo, da je morda med pomnoževanjem v sekvencijski reakciji nastalo več različnih pomnožkov. Na kromatogramu je to vidno kot signal različnih nukleotidov na istem mestu. To je lahko posledica prisotnosti več sekvenc, na katere prilegajo začetni oligonukleotidi v isti molekuli matrične DNK. Tak primer bi bil možen, če bi se med ligacijo zlepilo več plazmidov pUC18 in eden ali več pomnožkov. V takem primeru bi bilo v matrični plazmidni DNK prisotnih več sekvenc, na katere prilega začetni oligonukleotid M13r, kar bi posledično vodilo do pomnoževanja različnih sekvenc in v končni fazi neberljivega kromatograma. Tega ne moremo popolnoma izključiti, vendar smo ob pregledu agaroznih

gelov opazili izrazitejše odstopanje v velikosti izoliranih plazmidov zgolj pri dveh klonih (K21L in K26E), ki pa jih nismo sekvencirali. Druga možnost za nastajanje več različnih pomnožkov je prisotnost dveh ali več ločenih plazmidov z različnimi vključki v istem vzorcu izolirane plazmidne DNK. To je lahko posledica nezadostnega čiščenja belih kolonij celic, ki so bile transformirane s plazmidom z vključkom oz. navzkrižne kontaminacije med cepljenjem tekočih gojišč med postopkom namnoževanja in izolacije plazmidov. V obeh primerih bi v tekočem gojišču vzgojili mešano kulturo celic, ki so bile transformirane s plazmidi z različnimi vključki. Pri naših poskusih smo čiščenje, precepljanje kolonij in cepljenje tekočih gojišč izvajali izredno skrbno ob upoštevanju aseptičnih tehnik.

Vsekakor bi bilo smotrno izolirano plazmidno DNK vseh klonov ponovno sekvencirati, morda z začetnim oligonukleotidom Chl_16S(270)f ali Chl_16S(530)r, za katera so sekvence, na katere prilegata, zagotovo prisotne.

5.2 SKLEPI

- Prisotnost klamidijskih sekvenc genov za 16S rRNK smo dokazali v vzorcih štirih nevretenčarjev, v katerih klamidijski endosimbionti doslej še niso bili opisani.
- Analiza sekvenc pomnožkov klamidijskih genov za 16S rRNK je pokazala, da so te najbolj podobne sekvenci gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'.
- Pomnožki klamidijskih genov za 16S rRNK, pomnoženi z začetnima oligonukleotidoma Chl_16S(270)fpst in Chl_16S(530)rpst, so prekratki (200 bp) za zanesljivo filogenetsko analizo oz. natančnejše taksonomsko uvrščanje ali identifikacijo klamidij, iz katerih izvirajo.
- Uporabljeni PCR protokoli in par začetnih oligonukleotidov so se, kljub optimizaciji, izkazali za suboptimalne za specifično pomnoževanje zgolj tarčnih sekvenc genov za 16S rRNK.
- Za zanesljivejše rezultate s filogenetskega stališča bi morali pomnožiti daljše odseke klamidijskih genov za 16S rRNK in pozitivne rezultate potrditi pri večjem številu neodvisnih vzorcev nukleinskih kislin, osamljenih iz istih vrst živali. Pozitivni rezultati pri več neodvisnih vzorcih bi tudi izključili možnost, da so pozitivni rezultati v naših poskusih posledica navzkrižne kontaminacije vzorcev, do katere bi lahko prišlo med sekциjo živali, izolacijo nukleinskih kislin, pripravo reakcijskih mešanic za verižno reakcijo s polimerazo ali kloniranjem.
- Za dokončno potrditev, da so nevretenčarji *Dysdera ninnii*, *Asellus aquaticus*, *Julus sp.* in *Polydesmus sp.* res gostitelji klamidijskih endosimbiontov, bi morali v nadaljevanju raziskav dokazati tudi dejansko prisotnost klamidij v celicah omenjenih živali. Prisotnost klamidij lahko dokažemo s presevno elektronsko

mikroskopijo histoloških rezin in/ali fluorescentno mikroskopijo in uporabo za te klamidije specifičnih fluorescentnih lovk.

- Rezultati naše raziskave, kljub kratki dolžini analiziranih sekvenc, nakazujejo precejšnjo genetsko pestrost klamidij, sorodnih bakteriji '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*', pri nevretenčarjih in podpirajo domnevo, da so nevretenčarji pomemben naravni rezervoar klamidijskih endosimbiontov.

6 POVZETEK

Bakterije iz reda *Chlamydiales* so že dolgo znani povzročitelji različnih bolezni pri živalih in ljudeh. Čeprav so znanstveniki dolgo domnevali, da to skupino bakterij sestavlja le nekaj dokaj sorodnih vrst, izsledki nedavnih raziskav kažejo, da so sekvence, podobne klamidijskim ribosomskim sekvencam, prisotne v različnih vretenčarskih in nevretenčarskih živalskih gostiteljih, enoceličnih evkariontih in različnih okoljskih vzorcih. Mnoge od teh sekvenc pripadajo doslej še neopisanim predstavnikom reda *Chlamydiales*. Kljub tem odkritjem lahko domnevamo, da za veliko večino klamidij dejanski krog gostiteljev, razširjenost in genetska pestrost še niso raziskani.

V tem delu smo poskusili z verižno reakcijo s polimerazo DNK pomnožiti dele klamidijskih genov za 16S rRNK z za klamidije specifičnimi začetnimi oligonukleotidi v vzorcih nukleinskih kislin, osamljenih iz enajstih različnih nevretenčarjev. In sicer iz delov prebavil enakonožnih rakov *Porcellio scaber*, *Asellus aquaticus*, *Titanethes albus* in *Porcellionides pruinosus*, pajka *Dysdera ninnii*, ravnokrilca *Achaeta domesticus*, postranic *Gammarus sp.* in *Niphargus sp.* ter stonog *Julus sp.* in *Polydesmus sp.* Vzorci so bili izbrani na osnovi predhodne raziskave, med katero so uspešno pomnožili odseke genov za 16S rRNK s klamidijskimi začetnimi oligonukleotidi pri omenjenih enajstih nevretenčarjih (Mraz, 2006). Pomnožitev daljših odsekov klamidijskih genov za 16S rRNK ni uspela, saj je, ne glede na uporabljeni par začetnih oligonukleotidov, nastalo tudi večje število nespecifičnih pomnožkov ali pa pomnoževanje sploh ni uspelo. Zato smo za pomnoževanje klamidijskih 16S ribosomskih genov uporabili začetna oligonukleotida Chl_16S(270)f in Chl_16S(530)r, s katerima smo uspešno pomnožili približno 260 bp dolg del bakterijskih genov za 16S rRNK pri osmih od enajstih preučevanih vzorcev. Omenjeni par začetnih oligonukleotidov smo, za potrebe usmerjenega kloniranja pomnožkov v plazmid pUC18, spremenili tako, da smo sekvencama dodali tarčno mesto za restriktijsko endonukleazo *PstI*.

S *PstI* rezane in očiščene PCR pomnožke smo z ligacijo vstavili v plazmid pUC18, ki smo ga prav tako rezali s *PstI*. Ligacijske mešanice smo transformirali v kompetentne celice *E. coli* TOP10, transformacijske mešanice pa razmazali na selektivna trdna gojišča LB z

ampicilinom in X-gal. Izbira kolonij celic, transformiranih z vključkom v plazmidu, je temeljila na ti. modro-beli selekciji. Iz skupno 76 naključno izbranih klonov smo izolirali plazmide in izvedli restriktijsko analizo s *PstI*. Na podlagi rezultatov restriktijske analize smo izbrali 20 klonov in plazmide z vključki poslali sekvencirat.

Od dvajsetih sekvenčnih kromatogramov je bilo berljivih zgolj sedem. Uporabnim sekvencam smo poiskali najbolj podobne v bazah podatkov z orodjem BlastN in Fasta3. Rezultati sekvenčne analize kažejo, da je pet sekvenc (K5C, K5J, K17F, K21D in K23E), ki smo jih pomnožili iz vzorcev štirih različnih nevretenčarjev, klamidijskih, in da je vsem najbolj podobna sekvenca gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'. Sekvenci K14J in K23K pa najverjetneje nista klamidijski, saj so jima najbolj podobni sekvenci genov za 16S rRNK bakterij *Butyrivibrio fibrisolvens* Bu 43 in negojenega bakterijskega klena 29c-d9, ki je po podobnosti 16S ribosomskih sekvenc najbliže bakterijam iz rodu *Ruminococcus*. Dejstvo, da smo pomnožili tudi odseke neklamidijskih 16S ribosomskih genov, nakazuje, da uporabljeni začetni oligonukleotida morda nista tako specifična za klamidije, kot smo to ocenili na osnovi *in silico* analize. Za natančnejšo filogenetsko analizo bi morali uspešno pomnožiti daljše odseke (vsaj 1000 bp) genov za 16S rRNK. Rezultati naše raziskave, kljub kratki dolžini analiziranih sekvenc, nakazujejo precejšnjo genetsko pestrost klamidij, sorodnih '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*', v nevretenčarjih in podpirajo domnevo, da so nevretenčarji pomemben naravni rezervoar klamidij.

Vsekakor smo dokazali prisotnost klamidijskih sekvenc genov za 16S rRNK v vzorcih nukleinskih kislin, osamljenih iz štirih različnih nevretenčarjev, pri katerih klamidijski endosimbionti doslej še niso bili opisani. Gre za pajka *Dysdera ninnii*, enakonožnega raka *Asellus aquaticus* in stonogi *Julus sp.* in *Polydesmus sp.* Za potrditev, da so omenjeni nevretenčarji res gostitelji klamidijskih endosimbiontov, pa bi morali dokazati tudi dejansko prisotnost klamidij v celicah omenjenih živali.

6.1 SUMMARY

Bacteria belonging to the order *Chlamydiales* have long been known as pathogens of both humans and animals. Although scientists had assumed that this group of bacteria was composed of only few closely related species, recent findings suggest that sequences, with high degree of similarity to chlamydial ribosomal RNA sequences, are present in a variety of vertebrate and invertebrate hosts, unicellular eukaryotes and diverse environmental samples. Many of these sequences belong to novel members of the order *Chlamydiales*. These discoveries support the proposals that further investigation should be undertaken concerning host range, distribution and genetic diversity of chlamydiae.

In this work we attempted to amplify and further analyse parts of chlamydial 16S rRNA genes using PCR with chlamydiae-specific primers in samples from eleven different invertebrates. Total bacterial DNA was isolated from segments of digestive tract of isopod crustaceans (*Porcellio scaber*, *Asellus aquaticus*, *Titanethes albus* and *Porcellionides pruinosus*), an arachnid (*Dysdera ninnii*), an orthopteran insect (*Achaeta domesticus*), amphipod crustaceans (*Gammarus sp*, *Niphargus sp.*) and diplopod millipedes (*Julus sp.*, *Polydesmus sp.*). Samples were selected on the basis of previous research, where PCR amplification of 16S rRNA gene sequences, using chlamydiae-specific primers, yielded PCR products in all of the above mentioned invertebrate samples (Mraz, 2006). Attempts to amplify segments of chlamydial 16S rRNA genes, longer than 1000 bp, were unsuccessful, as PCR with different sets of forward (Chl_16S(270)f, Chla-2-18-f) and reverse primers (Chl_16S(1300)r, 1392R and R1401) yielded several unspecific products or no products at all. Best results were obtained using primers Chl_16S(270)f and Chl_16S(530)r. PCR with this set of primers yielded the expected 260 bp long products in eight out of eleven studied samples. Both primers were modified, for molecular cloning purposes, by addition of a short sequence, which included *PstI* restriction endonuclease target sequence, to 5' ends during primer synthesis.

PCR products, amplified with modified primers Chl_16S(270)fpst and Chl_16S(530)rpst, were cut with *PstI* enzyme and inserted into *PstI*-cut plasmid pUC18 by ligation with T4 ligase. Competent *E. coli* TOP10 cells were transformed with ligation mixtures and

transformed cells were spread on LB plates containing ampicillin and X-gal. Selection of colonies of cells transformed with pUC18 with PCR product inserts was based on 'blue-white selection'. Plasmid DNA was isolated from a total of 76 randomly selected bacterial clones and *PstI* restriction analysis was performed. Plasmid DNA with PCR product inserts of 20 different clones was sequenced using M13r as sequencing primer.

Examination of sequencing chromatograms using FinchTV software revealed that only seven sequencing reactions were successful. We searched online nucleotide sequence databases for most similar sequences using BlastN and Fasta3 software tools. Sequence analyses revealed that sequences of clones K5C, K5J, K17F, K21D and K23E are chlamydial and showed highest degree of similarity to 16S rRNA gene sequence of bacteria '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'. Sequences K14J and K23K are most likely not chlamydial, as they exhibit highest similarity to 16S rRNA gene sequences of *Butyrivibrio fibrisolvens* Bu 43 and uncultured bacterium clone 29c-d9, which is, according to 16S rRNA gene sequence similarity, most similar to bacteria of the genus *Ruminococcus*. PCR amplification of non-chlamydial 16S rRNA sequences suggests, that used primers are perhaps not as specific for chlamydiae as we assumed based on *in silico* analysis. To obtain more accurate and phylogenetically reliable results it would be necessary to amplify at least 1000 bp long part of 16S rRNA gene sequences. Results of our research suggest, despite relative shortness of analysed segments of 16S rRNA genes, that high genetic diversity exists among chlamydiae related to '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' in invertebrate hosts and support proposals that invertebrates are an important natural pool of chlamydiae.

We have certainly proven the presence of chlamydial 16S rRNA gene sequences in DNA samples from four different invertebrates, in which chlamydiae had not been described previously, namely arachnid *Dysdera ninnii*, isopod crustacean *Asellus aquaticus* and millipedes *Julus sp.* and *Polydesmus sp.* To confirm, that these invertebrate species are truly hosts to chlamydial endosymbionts, we would also have to prove that chlamydiae are in fact present in cells of their putative hosts by some alternative approach, for example *in situ* hybridization with fluorescently labelled specific oligonucleotide probes.

7 VIRI

Amman R. I., Ludwig W., Schleifer K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59, 1: 143 – 169

Amann R., Springer N., Schönhuber W., Ludwig W. Schmid E. N., Müller K. D., Michel R. 1997. Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to *Chlamydia* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 11: 115 – 121

Birtles R. J., Rowbotham T. J., Storey C., Marrie T. J., Raoult D. 1997. Chlamydia-like obligate parasite of free-living amoebae. *Lancet*, 349, 9056: 925 – 926

Bowman J. P., Rea S. M., McCammon S. A., McMeekin T. A. 2000. Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Vestfold Hills, Eastern Antarctica. *Environmental Microbiology*, 2, 2: 227 – 237

Brown M. V., Bowman J. P. 2001. A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 3: 267 – 275

Corsaro D., Thomas V., Goy G., Venditti D., Radek R., Greub G. 2006. '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' an intracellular bacterial pathogen of the cockroach *Blatta orientalis* (Insecta: Blattodea). *Systematic and Applied Microbiology*: 8 str., online avgust 2006

Corsaro D., Valassina M., Venditti D. 2003. Increasing diversity within Chlamydiae. *Critical Reviews in Microbiology*, 29, 1: 37 – 78

Corsaro D., Venditti D. 2004. Emerging chlamydial infections. *Critical Reviews in Microbiology*, 30, 2: 75 – 106

- Corsaro D., Venditti D., Valassina M. 2002. New chlamydial lineages from freshwater samples. *Microbiology*, 148, 22: 343 – 344
- Costa H. S., Westcot D. M., Ullman D. E., Rosell R., Brown J. K., Johnson M. W. 1995. Morphological variation in *Bemisia* endosymbionts. *Protoplasma*, 189, 3-4: 194-202.
- Crespo S., Zarza C., Padros F., Marin de Mateo M. 1999. Epitheliocystis agents in sea bream *Sparus aurata*: morphological evidence for two distinct chlamydia-like developmental cycles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37, 1: 61 – 72
- Draghi A., Popov V. L., Kahl M. M., Stanton J. B., Brown C. C., Tsongalis G. J., West B., Frasca S. Jr. 2004. Characterization of "Candidatus Piscichlamydia salmonis" (Order *Chlamydiales*), a chlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 11: 5286 - 5297
- Drobne D., Štrus J., Žindaršič N., Zidar P. 1999. Morphological description of bacterial infection of digestive glands in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). *Journal of Invertebrate Pathology*, 73, 1: 113 – 119
- Essing A., Heinemann M., Simnacher U., Marre R. 1997. Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4: 1396 – 1399
- Everet K. D .E. 2000. *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. *Veterinary Microbiology*, 75, 2: 109 – 126
- Everett K. D. E., Andersen A. A. 1997. The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 2: 461 – 473
- Everett K. D. E., Bush R. M., Andersen A. A. 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov.,

each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. International Journal of Systematic Bacteriology, 49, 2: 415 – 440

Everett K. D. E., Thao M., Horn M., Dyszynski G. E., Baumann P. 2005. Novel chlamydiae in whiteflies and scale insects: endosymbionts '*Candidatus Fritschea bemisiae*' strain Falk and '*Candidatus Fritschea eriococci*' strain Elm. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55: 1581 – 1587

Fritsche T. R., Horn M., Wagner M., Herwig R. P., Schleifer KH., Gautom R. K. 2000. Phylogenetic diversity among geographically dispersed *Chlamydiales* endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. Applied and Environmental Microbiology, 66, 6: 2613 – 2619

Fryer J. L., Lannan C. N. 1994. Rickettsial and chlamydial infections of freshwater and marine fishes, bivalves, and crustaceans. Zoological Studies, 33, 2: 95 - 107

Fukushi H., Hirai K. 1992. Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. International Journal of Systematic Bacteriology, 42: 306 – 308

Grayston J. T., Kuo C.-C., Campbell L. A., Wang S.-P. 1989. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. International Journal of Systematic Bacteriology, 39: 88 – 90

Groff J. M., LaPatra S. E., Munn R. J., Anderson M. L., Osburn B. I. 1996. Epitheliocystis infection in cultured white sturgeon (*Acipenser transmontanus*): antigenic and ultrastructural similarities of the causative agent to the chlamydiae. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 8, 2: 172 – 180

Homer B. L., Jacobson E. R., Schumacher J., Scherba G. 1994. Chlamydiosis in mariculture-reared green sea turtles (*Chelonia mydas*). Veterinary Pathology, 31, 1: 1 – 7

- Horn M., Collingro A., Schmitz-Esser S., Beier C. L., Purkhold U., Fartmann B., Brandt P., Nyakatura G. J., Droege M., Frishmann D., Rattei T., Mewes HW., Wagner M. 2004. Illuminating the evolutionary history of chlamydiae. *Science*, 304, 5671: 728 – 730
- Horn M., Wagner M. 2001. Evidence of additional genus-level diversity of *Chlamydiales* in the environment. *FEMS Microbiology Letters*, 204, 1: 71 – 74
- Horn M., Wagner M., Müller K.-D., Schmid E. N., Fritsche T. R., Schleifer K.-H., Michel R. 2000. *Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov. (*Parachlamydiaceae*), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology*, 146: 1231 – 1239
- Jacobson E. R., Telford S. R. 1990. Chlamydial and poxvirus infection of circulating monocytes of flap-necked chameleon (*Chamaeleo dilepis*). *Journal of Wildlife Diseases*, 26, 4: 572 – 577
- Kahane S., Dvoskin B., Mathias M., Friedman M. G. 2001. Infection of *Acanthamoeba polyphaga* with *Simkania negevensis* and *S. negevensis* survival within amoebal cysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 10: 4789 – 4795
- Kahane S., Metzer E., Friedman M. G. 1995. Evidence that the novel microorganism 'Z' may belong to a new genus in the family *Chlamydiaceae*. *FEMS Microbiology Letters*, 126, 2: 203 – 208
- Kaltenboeck B., Kousoulas K. G., Storz J. 1993. Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (*ompA*) genes of the four chlamydial species. *Journal of Bacteriology*, 175, 2: 487 – 502
- Kostanjšek R., Štrus J., Drobne D., Avguštin G. 2004. '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*', an intracellular bacterium from the hepatopancreas of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 543 – 549

- Lane D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. V: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds.). New York, John Wiley and Sons: 115 – 175
- Morel G. 1976. Studies of *Porochlamydia buthi* g. n., sp. n. an intracellular pathogen of the scorpion *Buthus occitanus*. Journal of Invertebrate Pathology, 26, 2: 167 – 175
- Mraz J. 2006. Odkrivanje doslej še neopisanih klamidij v živalskih gostiteljih. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 59 str.
- Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaidr J., Weishuber A., Amman R. I., Ludwig W., Backhaus H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. Journal of Bacteriology, 178, 19: 5636 – 5643
- Osaki H. 1973. Electron microscopic observations of chlamydia-like microorganism in hepatopancreas cells of the spider *Coelotes luctuosus*. Acta Arachnologica, 24: 23 – 36
- Ossewaarde J. M., Meijer A. 1999. Molecular evidence for existence of additional members of the order *Chlamydiales*. Microbiology, 145, 2: 411 – 417
- Pudjiatmoko, Fukushi H., Ochiai Y., Yamaguchi T., Hirai K. 1997. Phlyogenetic Analysis of the Genus *Chlamydia* Based on 16S rRNA Gene Sequances. International Journal of Systematic Bacteriology, 47, 2: 425 – 431
- Radek R. 2000. Light and electron microscopic study of a *Rickettsiella* species from the cockroach *Blatta orientalis*. Journal of Invertebrate Pathology, 76, 4: 249 – 256
- Schmalenberger A., Tebbe C. C. 2003. Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. Molecular Ecology, 12, 1: 251 – 262

Shay. M. T., Bettica A, Vernon G. M., Witkus E. R. 1985. *Chlamydia isopodii* sp. n., an obligate intracellular parasite of *Porcellio scaber*. Experimental Cell Biology, 53, 2: 115 – 120

Takahashi T., Masuda M., Tsuruno T., Mori Y., Takashima I., Hiramune T., Kikuchi N. 1997. Phylogenetic analyses of *Chlamydia psittaci* from birds based on 16S rDNA gene sequence. Journal of Clinical Microbiology, 35, 11: 2908 – 2914

Thao M. L., Baumann L., Hess J. M, Falk B. W., Ng J. C. K., Gullan P. J., Baumann P. 2003. Phylogenetic evidence for two new insect-associated chlamydia of the family *Simkaniaceae*. Current Microbiology, 47, 1: 46 – 50

Thomas V., Casson N., Greub G. 2006. *Criblamydia sequanensis*, a new intracellular *Chlamydiales* isolated from Seine river water using amoebal co-culture. Environmental Microbiology, online julij 2006

ZAHVALA

Rad bi se zahvalil vsem, ki so pomagali pri nastanku te diplomske naloge. Še posebej bi se rad zahvalil:

- mentorju prof. dr. Gorazdu Avguštinu za nadzor in produktivne nasvete tekom nastajanja tega dela;
- somentorju doc. dr. Roku Kostanjšku za vse praktične nasvete in podajanje znanja o klamidijah in njihovih gostiteljih;
- dr. Tomažu Accettu za pomoč in nasvete pri kloniranju in sekvenčni analizi;
- celotnemu kolektivu Katedre za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Oddelka za zootehniko v Domžalah, ker ste strpno prenašali parazitiranje prostora, opreme in materiala;
- prof. dr. Francu Viktorju Nekrepnu za hitro in konstruktivno recenzijo;
- staršema Zvezdani in Petru za neizmerno potrpežljivost in vso podporo med mojim (pre)doljim študijem;
- Maji za vso ljubezen, podporo in pomoč;
- nenazadnje Velikemu poku, s katerim se je vse skupaj sploh začelo...

PRILOGE

Prilogi A

Poravnava sekvene K5C z najbolj podobnimi sekvencami, pridobljenimi s FASTA

Seq: AY928092 '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' CRIB01 (1495 nt)
initn: 358 init1: 358 opt: 358 Z-score: 437.3 bits: 89.3 E(): 1.9e-15
banded Smith-Waterman score: 358; 96.104% identity (96.104% similar) in 77 nt overlap (1-77:257-333)

			10	20	30
K5C			<u>GACGTCAAGGCGGGCTGAGAGATTGACCGC</u>		
			::: :	::: :	::: :::
Seq	GTTGGTGTGGTAAAGGCGCACCAAGGCTAACGCTAGGCGATTGAGAGATTGACCGC				
	230	240	250	260	270
					280
			40	50	60
K5C	CAACATTGGGACTGAGACACTGCCAAACTCCTACGGGAGG <u>CTGCAG</u>				70
	::: :::	::: :::	::: :::	::: :::	
Seq	CAACATTGGGACTGAGACACTGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATCTTC				
	290	300	310	320	330

Priloga A1: Poravnava sekvene K5C s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' CRIB01.

Seq: AY223862 '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' (1366 nt)
initn: 358 init1: 358 opt: 358 Z-score: 437.7 bits: 89.3 E(): 1.9e-15
banded Smith-Waterman score: 358; 96.104% identity (96.104% similar) in 77 nt overlap (1-77:252-328)

			10	20	30
K5C			<u>GACGTCAAGGCGGGCTGAGAGATTGACCGC</u>		
			::: :	::: :	::: :::
Seq	GTTGGTGTGGTAAAGGCGCACCAAGGCTAACGCTAGGCGATTGAGAGATTGACCGC				
	230	240	250	260	270
					280
			40	50	60
K5C	CAACATTGGGACTGAGACACTGCCAAACTCCTACGGGAGG <u>CTGCAG</u>				70
	::: :::	::: :::	::: :::	::: :::	
Seq	CAACATTGGGACTGAGACACTGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATCTTC				
	290	300	310	320	330
					340

Priloga A2: Poravnava sekvene K5C s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'.

Prilogi B

Poravnavna sekvence K5J z najbolj podobnimi sekvencami, pridobljenimi s FASTA

Seq: AY223862 *Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis* (1366 nt)
initn: 862 init1: 862 opt: 862 Z-score: 974.1 bits: 189.8 E(): 2.6e-45
banded Smith-Waterman score: 862; 96.216% identity (96.216% similar) in 185 nt overlap (1-185:323-507)

K5J	10 20 30
	CTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGA ::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
Seq	CTGAGACACTGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGA 300 310 320 330 340 350
	40 50 60 70 80 90
K5J	AAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTGAGTGTGATGAAGGCTTCGGTTGTATAACTCTTCG ::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
Seq	AAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTGAGTGTGATGAAGGCTTCGGTTGTAAAACCTCTTCG 360 370 380 390 400 410
	100 110 120 130 140 150
K5J	CGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTGAATAACTGATGCATATGAAAGTACTGCGTAAAGAAC ::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
Seq	CGCAAGAGCAAAGTGGTTAGTGAATAACTAAGTCATATGAGAGTACTGCGTAAAGAAC 420 430 440 450 460 470
	160 170 180
K5J	ACCGGCTAACTCCGTGCC <u>ACGCAGCTGCGTAATAC</u> ::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
Seq	ACCGGCTAACTCCGTGCC <u>ACGCAGCTGCGTAATAC</u> GGAGGGTGCAAGCATTAATCGAATA 480 490 500 510 520 530

Priloga B1: Poravnavna sekvence K5J s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'.

Seq: AY928092 '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' CRIB01 (1495 nt)
initn: 742 init1: 461 opt: 720 Z-score: 811.3 bits: 159.8 E(): 2.8e-36
banded Smith-Waterman score: 720; 88.542% identity (88.542% similar) in 192 nt overlap (1-
185:328-519)

K5J	10 20 30
	<u>CTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGA</u> ::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::
Seq	CTGAGACACTGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGA 300 310 320 330 340 350
	40 50 60 70 80 90
K5J	AAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTGAGTGTGAAGGCTTCGGGTTGTATAACTCTTCG ::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::
Seq	AAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTGAGTGTGAAGGCTTCGGGTTGTAAAACCTCTTCG 360 370 380 390 400 410
	100 110 120 130 140
K5J	CGCAAGAGCAAA-GTGTATTAGTAGAATAACTGA---TG---CATATGAAAGTACTGCGTA ::: : ::: :::: : ::: ::: ::: :::: ::::
Seq	CGCAGGAAAAAACCAAGCTTAGTAGAATAACTAAATTGGGACTAGTGATTGTACTGCGTA 420 430 440 450 460 470
	150 160 170 180
K5J	AAGAACCGGCTAACTCCGTGCC <u>AGCAGCTGCGTAATAC</u> ::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::
Seq	AAGAACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCTGCGTAATACGGAGGGTCAAGCATTAA 480 490 500 510 520 530

Priloga B2: Poravnavo sekvence K5J s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' CRIB01.

Prilogi C

Poravnavo sekvence K14J z najbolj podobnimi sekvencami, pridobljenimi s FASTA in BlastN

Seq: X89976 *Butyrivibrio fibrisolvens* Bu 43 (1495 nt)
initn: 966 init1: 966 opt: 973 Z-score: 1049.1 bits: 204.2 E(): 1.6e-49
banded Smith-Waterman score: 973; 88.571% identity (88.571% similar) in 245 nt overlap (1-245:268-512)

K14J		10 20 30
		<u>GACGTCTGGCGAGCTGAGAGGGTGGACGG</u>
		:: : : : :: :: :: :: :: :: :: :: ::
Seq	GTTGGTGAGGTAAAGGCCACCAAGGCAGCATCTGTAGCCGACTGAGAGGTGGACGG	
	240 250 260 270 280 290	
	40 50 60 70 80 90	
K14J	CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGC	
	:: ::	
Seq	CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGATATTGC	
	300 310 320 330 340 350	
	100 110 120 130 140 150	
K14J	ACAATGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTAAGGAAGAAGTGTCTCGGTATGTA	
	:: ::	
Seq	ACAATGGAGGAAACTCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTCGGTATGTA	
	360 370 380 390 400 410	
	160 170 180 190 200 210	
K14J	AACCTCTATCAGCAGGGAAAGAAAGTGGCTTCGGCCATATGACGGTACCTGACTAAGAAC	
	:: ::	
Seq	AAGCTCTATCAGCAGGGAAAGAAAGGCTCTCGGAGAGATGACGGTACCTGACTAAGAAC	
	420 430 440 450 460 470	
	220 230 240	
K14J	CCCGGCTAATTACGTGCC <u>CAGCCGCTGCGTAATAC</u>	
	:: ::	
Seq	CCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATT	
	480 490 500 510 520 530	

Priloga C1: Poravnavo sekvence K14J s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije *Butyrivibrio fibrisolvens* Bu 43.

Seq: DQ905902 Uncultured bacterium clone 29c-d9

K14J	10 20 30
	GACGTCTGGCGAGCTGAGAGGGTGGACGG
	:: : : : :: : :: : :: : :: : :: :
29c-d9	GATCCATAGCCGGCCTGAGAGGGTGGACGG
	330 340 350
K14J	40 50 60 70 80 90
	CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGC
	:: :
29c-d9	CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGC
	360 370 380 390 400 410
K14J	100 110 120 130 140 150
	ACAATGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTGTCTCGGTATGTA
	:: :
29c-d9	ACAATGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTA
	420 430 440 450 460 470
K14J	160 170 180 190 200 210
	AACTTCTATCAGCAGGGAAGAAAAGTGGCTTCGGCATATGACGGTACCTGACTAAGAAC
	:: :
29c-d9	AACTTCTATCAGCAGGGAAGAAA-----ATGACGGTACCTGACTAAGAAC
	480 490 500 510
K14J	220 230 240
	CCCGGCTAATTACGTGCC <u>CAGCCGCTGCGTAATAC</u>
	:: : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
29c-d9	CCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATAC
	520 530 540 550

Priloga C2: Poravnava sekvene K14J s sekvenco gena za 16S rRNK bakterijskega klena 29c-d9 iz debelega črevesa človeka.

Prilogi D

Poravnava sekvene K17F z najbolj podobnimi sekvencami, pridobljenimi s FASTA

Seq: AY223862 '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' (1366 nt)
initn: 871 init1: 871 opt: 871 Z-score: 1000.4 bits: 194.6 E(): 8.9e-47
banded Smith-Waterman score: 871; 96.757% identity (96.757% similar) in 185 nt overlap (1-185:323-507)

K17F		10	20	30
		<u>CTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGA</u>		
		::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::		
Seq	CTGAGACACTGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGA			
	300 310 320 330 340 350			
		40 50 60 70 80 90		
K17F	AAGCCTGACGAATCGACGCTGCGTGAGTGATGAAGGCTTCGGGTTGTAAAACCTTTCG			
	::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::			
Seq	AAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTGAGTGATGAAGGCTTCGGGTTGTAAAACCTTTCG			
	360 370 380 390 400 410			
		100 110 120 130 140 150		
K17F	CGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTAGATAACTGATGCATATGAGAGTACTGCGTAAAGAACG			
	::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::			
Seq	CGCAAGAGCAAAGTGGTTAGTAGATAACTAAGTCATATGAGAGTACTGCGTAAAGAACG			
	420 430 440 450 460 470			
		160 170 180		
K17F	ACCGGCTAACTCCGTGCC <u>AGCAGCTGCGGTAAATAC</u>			
	::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::			
Seq	ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCTGCGGTAAATACGGAGGGTGCAAGCATTAATCGAATA			
	480 490 500 510 520 530			

Priloga D1: Poravnava sekvene K17F s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'.

Seq: AY928092 'Candidatus Rhabdochlamydia crassificans' CRIB01 (1495 nt)
initn: 742 init1: 461 opt: 720 Z-score: 824.4 bits: 162.2 E(): 5.1e-37
banded Smith-Waterman score: 720; 88.542% identity (88.542% similar) in 192 nt overlap (1-185:328-519)

K17F	10 20 30
	CTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGA
	::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
Seq	CTGAGACACTGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGA
	300 310 320 330 340 350
K17F	40 50 60 70 80 90
	AAGCCTGACGAATCGACGCTGCGTGAGTGATGAAGGCTTCGGTTGTAAAACCTTTCG
	::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
Seq	AAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTGAGTGATGAAGGCTTCGGTTGTAAAACCTTTCG
	360 370 380 390 400 410
K17F	100 110 120 130 140
	CGCAAGAGCAAA-GTGTATTAGTGAATAACTGA---TG---CATATGAGAGTACTGCGTA
	::: : ::: ::::: ::::: : ::: ::: ::::: :::::
Seq	CGCAGGAAAAAACCAAGCTTAGTGAATAACTAAATTGGGACTAGTGATTGTACTGCGTA
	420 430 440 450 460 470
K17F	150 160 170 180
	AAGAACGCCGGCTAACTCCGTGCC <u>CAGCAGCTGCCGTAAATAC</u>
	::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
Seq	AAGAACGCCGGCTAACTCCGTGCC <u>CAGCAGCTGCCGTAAATACGGAGGGTGCAAGCATTAA</u>
	480 490 500 510 520 530

Priloga D2: Poravnava sekvence K17F s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije 'Candidatus Rhabdochlamydia crassificans' CRIB01.

Prilogi E

Poravnava sekvene K21D z najbolj podobnimi sekvencami, pridobljenimi s FASTA

Seq: AY223862 '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*' (1366 nt)
initn: 871 init1: 871 opt: 871 Z-score: 994.6 bits: 193.6 E(): 1.9e-46
banded Smith-Waterman score: 871; 96.757% identity (96.757% similar) in 185 nt overlap (1-185:323-507)

K21D		10	20	30		
		CTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGA				
		:::-----				
Seq	CTGAGACACTGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGA					
	300	310	320	330	340	350
	40	50	60	70	80	90
K21D	AAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTGAGTGATGAAGGCTTCGGGTTGTAAAACCTTTCG					
	360	370	380	390	400	410
	100	110	120	130	140	150
K21D	CGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTAGATAACTGACGCATATGAGAGTACTGCGTAAAGAACG					
	420	430	440	450	460	470
	160	170	180			
K21D	ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATAC					
	480	490	500	510	520	530

Priloga E1: Poravnava sekvene K21D s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis*'.

Seq: AY928092 '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' CRIB01 (1495 nt)
initn: 742 init1: 470 opt: 720 Z-score: 819.8 bits: 161.4 E(): 9.2e-37
banded Smith-Waterman score: 720; 88.542% identity (88.542% similar) in 192 nt overlap (1-185:328-519)

K21D	10 20 30
	CTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGA ::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::
Seq	CTGAGACACTGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGA 300 310 320 330 340 350
K21D	40 50 60 70 80 90
	AAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTGAGTGTGATGAAGGCTTCGGTTGTAAA ::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::
Seq	AAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTGAGTGTGATGAAGGCTTCGGTTGTAAA 360 370 380 390 400 410
K21D	100 110 120 130 140
	CGCAAGAGCAAA-GTGTATTAGTGAATAACTGA----CGCATA-TGAGAGTACTGCGTA ::: : ::: :::: :::: ::: : :: : :::: ::::
Seq	CGCAGGAAAAAACCAAGCTTAGTGAATAACTAAATTGGGACTAGTGATTGACTGCGTA 420 430 440 450 460 470
K21D	150 160 170 180
	AAGAACGCCGGCTAACTCCGTGCC <u>AGCAGCCGGTAATAC</u> ::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::
Seq	AAGAACGCCGGCTAACTCCGTGCC <u>AGCAGCTCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCATTAA</u> 480 490 500 510 520 530

PrilogaE2: Poravnavo sekvence K21D s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*' CRIB01

Prilogi F

Poravnava sekvence K23E z najbolj podobnimi sekvencami, pridobljenimi s FASTA

Seq: AY223862 'Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis' (1366 nt)
initn: 551 init1: 551 opt: 571 Z-score: 614.1 bits: 122.7 E(): 2.9e-25
banded Smith-Waterman score: 571; 92.593% identity (92.593% similar) in 135 nt overlap (1-135:376-507)

K23E	10 20 30
	TGAGTGTGATGAAGGCTTCGGGTTGTTAAAC ::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
Seq: TGGGCGAAAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTGAGTGATGAAGGCTTCGGGTTGTAAC	
	350 360 370 380 390 400
K23E	40 50 60 70 80 90
	TCTTCGCGCAAGAGCAAAGTGATTAGTAGAACAAC
Seq: TCTTCGCGCAAGAGCAAAGTGGTTAGTAGATAACTAAC	410 420 430 440 450 460
K23E	100 110 120 130
	AAGAACCGGCTAACTCCGTGCCAG <u>CAGCCGCTGCGTAATT</u> C
Seq: AAGAACCGGCTAACTCCGTGCCAGCA--GCTGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCAT	470 480 490 500 510

Priloga F1: Poravnava sekvence K23E s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije 'Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis'.

Seq: AY928092 'Candidatus Rhabdochlamydia crassificans' CRIB01 (1495 nt)
initn: 379 init1: 205 opt: 443 Z-score: 474.3 bits: 97.0 E(): 1.6e-17
banded Smith-Waterman score: 443; 82.394% identity (82.394% similar) in 142 nt overlap (1-135:381-519)

K23E	10 20 30
	TGAGTGATGAAGGCTTCGGGTTGTTAAC
	::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
Seq: TGGGCGAAAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTGAGTGATGAAGGCTTCGGGTTGTAAAAC	
360 370 380 390 400 410	
	40 50 60 70 80
K23E TCTTTCGCGCAAGAGCAAAGTGA-TTTAGTGAACAACGTGAAT-----CATGTGAGAGTA	
	::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
Seq: TCTTTCGCGCAGGAAAAACCAAGCTTAGTGAATAACTAAATTGGGACTAGTGATTGTA	
420 430 440 450 460 470	
	90 100 110 120 130
K23E CTGCGTAAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG <u>CAGCCGCTGC</u> GGTAATTC	
	::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
Seq: CTGCGTAAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCA---GCTCGGTAATA <u>CGGAGGGTG</u>	
480 490 500 510 520	

Priloga F2: Poravnava sekvence K23E s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije 'Candidatus Rhabdochlamydia crassificans' CRIB01

Prilogi G

Poravnavo sekvene K23K z najbolj podobnimi sekvencami, pridobljenimi s FASTA in
BlastN

Seq: X89976 <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> Bu 43 (1495 nt)						
initn: 970 init1: 970 opt: 991 Z-score: 1077.1 bits: 209.4 E(): 4.3e-51						
banded Smith-Waterman score: 991; 89.388% identity (89.388% similar) in 245 nt overlap (1-245:268-512)						
K23K			10	20	30	
			GACGTCTAGGCGGGTTGAGAGGGTGGACGG			
			:::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::			
Seq	GTTGGTGAGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCTGTAGCCGACTGAGAGGTGGACGG					
	240	250	260	270	280	290
K23K		40	50	60	70	80
	CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGC					
	::::::::::: ::::::::::: ::::::: ::::::: ::::::: ::::::: :::::::					
Seq	CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGATATTGC					
	300	310	320	330	340	350
K23K		100	110	120	130	140
	ACAATGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTAAGGAAGAAGTGTCTCGGTATGTA					
	::::: ::::::: ::::::: ::::::: ::::::: ::::::: :::::::					
Seq	ACAATGGAGGAAACTCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTCGGTATGTA					
	360	370	380	390	400	410
K23K		160	170	180	190	200
	AACTTCTATCAGCAGGGAAAGAAAGTGGCTTCGGCCATATGACGGTACCTGACTAAGAAC					
	:::: ::::::: ::::::: ::::::: ::::::: ::::::: :::::::					
Seq	AAGCTCTATCAGCAGGGAAAGAAAGGCTCTCGGAGAGATGACGGTACCTGACTAAGAAC					
	420	430	440	450	460	470
K23K		220	230	240		
	CCCGGCTAATTACGTGCC <u>CAGCCGCCGCGTAATAC</u>					
	::::: ::::::: ::::::: ::::::: ::::::: :::::::					
Seq	CCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATT					
	480	490	500	510	520	530

Priloga G1: Poravnavo sekvene K23K s sekvenco gena za 16S rRNK bakterije *Butyrivibrio fibrisolvens* Bu 43.

Seq: DQ905902 Uncultured bacterium clone 29c-d9

		10	20	30			
K23K		<u>GACGTCTAGGCGGGTTGAGAGGGTGGACGG</u>					
		:::	::::::::::	::::::::::::			
29c-d9		GATCCATAGCCGGCCTGAGAGGGTGGACGG					
		330	340	350			
		40	50	60	70	80	90
K23K	CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGC						
	::::::::::						
29c-d9	CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGC						
	360	370	380	390	400	410	
		100	110	120	130	140	150
K23K	ACAATGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTGTCTCGGTATGTA						
	::::::::::						
29c-d9	ACAATGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTA						
	420	430	440	450	460	470	
		160	170	180	190	200	210
K23K	AACTTCTATCAGCAGGGAAAGAAAAGTGGCTTCGGCCATATGACGGTACCTGACTAAGAAC						
	::::::::::						
29c-d9	AACTTCTATCAGCAGGGAAAGAAA-----ATGACGGTACCTGACTAAGAAC						
	480	490	500	510			
		220	230	240			
K23K	CCCGGCTAATTACGTGCC <u>CAGCCGCCGCGTAATAC</u>						
	::::::::::						
29c-d9	CCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCCGCGTAATAC						
	520	530	540	550			

Priloga G2: Poravnava sekvence K23K s sekvenco gena za 16S rRNK bakterijskega klena 29c-d9 iz debelega črevesa človeka.

Priloge H

Poravnava klamidijskih sekvenc med seboj

K5J		10	20	30			
		<u>CTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGA</u>					
		::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::					
K17F		<u>CTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGA</u>	10	20	30		
	40	50	60	70	80	90	
K5J	AAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTGAGTGTAGAAGGCTTCGGGTTGTATAACTCTTCG	::::::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::: :::::::::::::					
	::::::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::: ::::::::::::: :::::::::::::						
K17F	AAGCCTGACGAATCGACGCTGCGTGAGTGTAGAAGGCTTCGGGTTGTAAAACCTCTTCG	40	50	60	70	80	90
	100	110	120	130	140	150	
K5J	CGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTGAATAACTGATGCATATGAAAGTACTGCGTAAAGAAC	::::::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::: :::::::::::::					
	::::::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::: ::::::::::::: :::::::::::::						
K17F	CGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTGAATAACTGATGCATATGAGAGTACTGCGTAAAGAAC	100	110	120	130	140	150
	160	170	180				
K5J	ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCTGCGTAATAC	::::::::::: :::::::::::::					
	::::::::::: ::::::::::::: :::::::::::::						
K17F	ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCTGCGTAATAC	160	170	180			

Priloga H1: Poravnava sekvenc K5J in K17F

		10	20	30	
K5J		<u>CTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGA</u>			
		:::-----			
K21D		<u>CTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGCGA</u>			
		10	20	30	
		40	50	60	70
K5J	AAGCCTGACGAAGCGACGCTCGTGAGTGTAGAAGGCTTCGGTTGTATAACTCTTCG				80
	::::-----				90
K21D	AAGCCTGACGAAGCGACGCTCGTGAGTGTAGAAGGCTTCGGTTGTAAAACCTCTTCG				
	40	50	60	70	80
					90
		100	110	120	130
K5J	CGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTAGAATAACTGATGCATATGAAAGTACTCGTAAAGAAC				140
	::::-----				150
K21D	CGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTAGAATAACTGACGCATATGAGAGTACTCGTAAAGAAC				
	100	110	120	130	140
					150
		160	170	180	
K5J	ACCGGCTAACTCCGTGCC <u>AGCAGCTCGGTAATAC</u>				
	::::-----				
K21D	ACCGGCTAACTCCGTGCC <u>AGCAGCCGCGTAATAC</u>				
	160	170	180		

Priloga H2: Poravnava sekvenc K5J in K21D

	40	50	60	70	80	
K5J	AAGCCTGACGAAGCGACGCTCGTGAGTGTAGAAGGCTTCGGTTGTATAAC					
	::::-----					
K23E		TGAGTGATGAAGGCTTCGGTTGTTAAC				
		10	20	30		
		90	100	110	120	130
K5J	TCTTCGCGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTAGAATAACTGATGCATATGAAAGTACTCGTA					140
	::::-----					
K23E	TCTTCGCGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTAGAACAACGTGAATCATGTGAGAGTACTCGTA					
	40	50	60	70	80	90
		150	160	170	180	
K5J	AAGAACCGGCTAACTCCGTGCC <u>AGCAG---CTCGGTAATAC</u>					
	::::-----					
K23E	AAGAACCGGCTAACTCCGTGCC <u>AGCAGCCGCTCGGTAATTC</u>					
	100	110	120	130		

Priloga H3: Poravnava sekvenc K5J in K23E

		10	20	30	
K17F		<u>CTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGGC</u> GA			
K21D		:::.....:::.....:::.....:::.....:::			
		<u>CTGCAGTCGAGAATCTTCGCAATGGGC</u> GA			
		10	20	30	
		40	50	60	70
K17F	AAGCCTGACGAATCGACGCTGCGTGAGTGTAGAAGGCTTCGGGTTGTAAAAC	80	90		
K21D:::.....:::.....:::.....:::.....:::				
		40	50	60	70
K17F	CGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTAGAATAACTGATGCATATGAGAGTACTCG	130	140	150	
K21D	CGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTAGAATAACTGACGCATATGAGAGTACTCG	130	140	150	
		100	110	120	
K17F:::.....:::.....:::.....:::.....:::				
K21D:::.....:::.....:::.....:::.....:::				
		100	110	120	
K17F	ACCGGCTAACTCCGTGCC <u>AGCAGCTGCGGTAATAC</u>	140	150		
K21D	ACCGGCTAACTCCGTGCC <u>AGCAGCCGCGGTAATAC</u>	140	150		
		160	170	180	
K17F:::.....:::.....:::.....:::.....:::				
K21D:::.....:::.....:::.....:::.....:::				
		160	170	180	

Priloga H4: Poravnava sekvenc K17F in K21D

	40	50	60	70	80	
K17F	AAGCCTGACGAATCGACGCTGCGTGAGTGTAGAAGGCTTCGGGTTGTAAAAC					
K23E:::.....:::.....:::.....:::.....:::					
		10	20	30		
		90	100	110	120	130
K17F	TCTTCGCGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTAGAATAACTGATGCATATGAGAGTACTCG	140				
K23E:::.....:::.....:::.....:::.....:::					
		40	50	60	70	80
K17F:::.....:::.....:::.....:::.....:::					
K23E:::.....:::.....:::.....:::.....:::					
		100	110	120	130	140
K17F	ACCGGCTAACTCCGTGCC <u>AGCAGCTGCGGTAATAC</u>	150	160	170	180	
K23E	ACCGGCTAACTCCGTGCC <u>AGCAGCCGCTGCGGTAATTC</u>	100	110	120	130	

Priloga H5: Poravnava sekvenc K17F in K23E

	40	50	60	70	80	
K21D	AAGCCTGACGAAGCGACGCTGCGTGAGTGATGAAGGCTTCGGGTTGTAAAAC					
	: :					
K23E	TGAGTGATGAAGGCTTCGGGTTGTTAAAC					
	10	20	30			
	90	100	110	120	130	140
K21D	TCTTTCGCGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTAGATAACTGATGCATATGAGAGTACTGCGTA					
	: :					
K23E	TCTTTCGCGCAAGAGCAAAGTGTATTAGTAGAACAACTGAATCATGTGAGAGTACTGCGTA					
	40	50	60	70	80	90
	150	160	170	180		
K21D	AAGAACCGGCTAACTCCGTGCC <u>CAGCAGCCG</u> ---CGGTAATAC					
	: :					
K23E	AAGAACCGGCTAACTCCGTGCC <u>CAGCAGCCG</u> TGCGGTAATC					
	100	110	120	130		

Priloga H6: Poravnava sekvenč K21D in K23E

Priloga I

Poravnavo sekvenc K14J in K23K

K14J						
	10	20	30	GACGTCTGGCGAGCTGAGAGGGTGGACGG	:	:
K23K	10	20	30	GACGTCTAGGCGGGTTGAGAGGGTGGACGG	:	:
K14J	40	50	60	70	80	90
CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGC	:	:	:	:	:	:
K23K	40	50	60	70	80	90
CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGC	:	:	:	:	:	:
K14J	100	110	120	130	140	150
ACAATGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTGTCTCGGTATGTA	:	:	:	:	:	:
K23K	100	110	120	130	140	150
ACAATGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTGTCTCGGTATGTA	:	:	:	:	:	:
K14J	160	170	180	190	200	210
AACTTCTATCAGCAGGGAAGAAAGTGGCTTCGGCATATGACGGTACCTGACTAAGAACG	:	:	:	:	:	:
K23K	160	170	180	190	200	210
AACTTCTATCAGCAGGGAAGAAAGTGGCTTCGGCATATGACGGTACCTGACTAAGAACG	:	:	:	:	:	:
K14J	220	230	240			
CCCGGCTAATTACGTGCCAGCCGCTGCGGTAATAC	:	:	:			
K23K	220	230	240			
CCCGGCTAATTACGTGCCAGCCGCCGCGGTAATAC	:	:	:			