Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno – biotehnološki fakultet

Ivana Čigir i Jana Jazbec

*In vitro* funkcionalno djelovanje modificiranih laktobacila na epitelne stanice karcinoma grkljana HEp2

Zagreb, 2015

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za sistemsku medicinu, Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ i u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, pod vodstvom dr.sc. Ksenije Durgo, izvanredne profesorice Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc. Ane Butorac i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2014/2015.

1**Uvod**

**1.1 STANIČNA LINIJA**

U svrhu istraživanja učinaka kemijskih, bioloških ili fizikalnih agenasa, koriste se različiti test sustavi. U počecima toksikoloških istraživanja, kao modelni test sustavi najčešće su se koristile životinje. Skupoća održavanja, dugotrajnost istraživanja, veliki gubici koji su se javljali ukoliko se istraživani agens pokazao kao neupotrebljiv zbog svojih (geno)toksičnih karakteristika te nadasve etička pitanja vezana za opravdanost korištenja životinja u ekperimentalne svrhe, doveli su do konstrukcije alternativnih bioloških test sustava koji u puno kraćem vremenu i s vrlo visokom pouzdanošću mogu pomoći u zaključivanju kakav je učinak nekog agensa na stanice odnosno organizam. Tako je, između ostalog, došlo i do konstrukcije niza kultura stanica dobivenih iz tkiva životinja i ljudi. Pri uspostavi stanične kulture razlikuju se primarna linija (stanice diobama stare, te se mogu podijeliti svega nekoliko puta) i stanična linija.Stanična linija je trajno uspostavljena kultura stanica koje se mogu neograničeno razmnožavati, ukoliko imaju adekvatan, svjež medij i prostor za rast. Linije se razlikuju ovisno o vrsti tkiva iz kojeg su izolirane, a osnovno im je svojstvo da su to stanice koje su „izbjegle“ Hayflickovu granicu i postale „besmrtne“ (Anonymous 1, 2015). Leonard Hayflick otkrio je da kultura normalnih ljudskih stanica ima ograničen kapacitet dijeljenja, nakon kojeg postaju stare. Taj fenomen poznat je kao „Hayflickova granica“ (Shay i Woodring, 2000). Kod nekih vrsta, osobito glodavaca, do linija se dolazi relativno lako, dok kod drugih vrsta to nije slučaj. Ne postoji stanična linija dobivena iz tkiva ptica, a uspostavljanje stanične linije iz ljudskog tkiva je teško (Anonnymous 1, 2015).

**1.2STANIČNA HUMANA LINIJA HEp2**

Stanična linija HEp2 predstavlja kontinuiranu liniju humanog epidermoidnog karcinoma grkljana. Ovu liniju uspostavile su, 1952. godine, Alice E. Moore, Lillian Sabachewski i Helene W. Toolan. Dobivena je od tumora koji je induciran u mladim štakorima nakon inokulacije s ljudskim epidermoidnim kancerogenim tkivom izoliranim iz 56-godišnjeg muškarca. Izolacija stanica *in vitro* izvedena je u suspenziji koja je sadržavala goveđu amniotičku tekućinu (eng. Bovine Amniotic Liquid), ekstrakt embrija, ljudski i konjski serum i otopinu soli. Stanična linija ima razinu biosigurnosti 2, jer stanice sadrže Papovavirus. Stanice ove linije sadrže kromosomski marker HeLa. Primjena HEp2 stanične linije vrlo je široka pa se tako koristi u proučavanju virusa ( Herpes simplex virus, adenovirusi, enterovirusi, hepatitis B itd.). S obzirom da mnogi mikroorganizmi stupaju u interakcije sa stanicama ljudskog organizma i tako uzrokuju oštećenja i smrt stanica, te mogu, zbog stupanja u interakcije s membranskim proteinima stanica, izazivati promjene u biokemijskim reakcijama u stanicama, Stanice HEp2 predstavljaju dobar model za proučavanje i uspostavljanje dijagnoza u *in vitro* uvjetima, ne samo vezano uz viruse, već i uz bakterije i njihove produkte. Ova stanična linija primjenjuje se u medicini za identifikaciju antinuklearnih antitijela te u staničnoj biologiji za istraživanje staničnih receptora. HEp2 stanice prikladne su za istraživanja vezana za tumore i antitumorsku terapiju. Stanična linija HEp2 opisana je u ATTC (<http://lgcstandards-atcc.org/>) pod brojem CCL-23 (Draganov, 2008).

**1.3BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE**

Bakterije mliječne kiseline (BMK) ujedinjuju široku skupinu gram pozitivnih bakterija, specifičnih morfoloških, metaboličkih i fizioloških karakteristika. Općenito, to su nesporogene, anaerobne, aerotolerantne bakterije, koje proizvode mliječnu kiselinu kao glavni produkt fermentacije ugljikohidrata. Pojam bakterija mliječne kiseline usko je povezan s fermentacijom hrane i stočne hrane, uključujući bakterije vezane za mukozne površine zdravih ljudi i životinja (Axelsson, 2004).

S obzirom na mogućnost fermentacije ugljikohidrata bakterije mliječne kiseline dijelimo na dvije skupine: homofermentativne i heterofermentativne. Homofermentatitvne bakterije u procesu glikolize (Embden-Meyerhof-Parnasov put, EMP) proizvode samo mliječnu kiselinu dok heterofermentativne u fotoketolaznom putu uz mliječnu kiselinu proizvode značajne količine ugljikovog dioksida (CO2), etanola ili acetata (Kandler, 1983). Fermentacija glukoze u bakterija mliječne kiseline prikazana je na slici 1.

BMK tvore skupinu mikroorganizama koji imaju nizak udio GC parova. To su gram pozitivne bakterije koje zauzimaju važnu ulogu u gastrointestinalnom (GI) traktu ljudi i životinja. Da bi povoljno utjecali na fiziologiju čovjeka, BMK prijanjaju na površinu intestinalnih stanica kroz mucin, ekstracelularni matriks, i lektin. Iako je njihova uloga u intestinalnom mikrookolišu predmet opsežnog istraživanja, učinak BMK na stanicama nije u potpunosti razjašnjen, jer je gastrointestinalna sluznica snažna zaštitna barijera između epitela i lumena, koji sadrži štetne tvari i mikroorganizme (Ohta i sur., 2012).

Mnoge vrste bakterija mliječne kiseline dobile su GRAS status (eng. Generally Recognized as Safe) od strane Američke agencije za hranu i lijekove (eng. Food and Drug Administration, FDA) čime je odobreno njihovo korištenje za poboljšavanje senzorskih i zdravstvenih svojstava hrane (Maassen, 1999).

Poznato je da bakterije mliječne kiseline proizvode antimikrobne tvari, uključujući i metabolite, kao što su organske kiseline, vodikov peroksid, laktoperoksidaza, diacetil, te druge antimikrobne tvari, kao što su bakteriocini. Proizvodnjom antimikrobnih tvari bakterije mliječne kiseline ometaju razmnožavanje nepoželjnih crijevnih mikroorganizama, a s druge strane onemogućavaju vezanje patogenih mikroorganizama za crijevni epitel u većem broju. Mikroflora humanog probavnog sustava normalno je vrlo uravnotežena i stabilna. Međutim, taj se sustav može narušiti pod utjecajem različitih vanjskih i unutrašnjih uvjeta, kao što su prehrana, mikroorganizmi iz hrane, infekcije ili antibiotici. Narušavanje uravnoteženog mikrobnog sustava probavnog trakta vrlo često uzrokuje pojavu bolesti organizma (Kršev i Borović, 1994).



**Slika 1.** Fermentacija glukoze u bakterija mliječne kiseline : (A) homolaktična fermentacija (Embden-Meyerhof-Parnas put); (B) heterolačna fermentacija (pentoza fosfatni put / fosfoketolazni put). Selektirani enzimi su numerirani: 1.glukokinaza; 2. fruktoza-1,6-difosfat aldolaza; 3. gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza; 4. piruvat kinaza; 5. laktat dehidrogenaza; 6. glukoza-6-fosfat dehidrogenaza; 7. 6-fosfoglukonat dehidrogenaza; 8. fosfoketolaza; 9. acetaldehid dehidrogenaza; 10. alkohol dehidrogenaza (prilagođeno prema Axelsson, 2005).

**1.3.1Taksonomija bakterija mliječne kiseline**

Taksonomija ili sistematizacija definira se kao proces katalogiziranja bioraznolikosti kao znanstvene discipline koja proučava sličnosti i različitosti između organizama s krajnjim ciljem karakterizacije i organizacije organizama u smislenu cjelinu i red (Schleifer i Ludwig, 1989). Klasifikacija, identifikacija i nomenklatura čine tri odvojene, ali povezane subdiscipline taksonomije. Klasifikacija je proces razvrstavanja organizama u taksonomske skupine („taxa“) na temelju sličnosti odnosno povezanosti. Identifikacija je proces određivanja pripadnosti novih izolata jednom od postojećih rodova, dok je nomenklatura dodijeljivaje imena taksonomskim grupama prema inetrnacionalnim pravilima (Staley i Krieg, 1984).

Sukladno „Taxonomic Outline of the Prokaryotes“ (Garrity i sur., 2004), rod *Lactobacillus* pripada redu *Firmicutes*, razred *Bacilli*, red *Lactobacillale*, obielj *Lactobacillaceae*. Rod *Lactobacillus* je trenutno najveća skupina bakterija unutar *Lactobacteriaceae*, a čini je više od sto vrsta (Canchaya i sur., 2006). Filogenetska struktura bakterija iz obitelji *Lactobacillaceae* prikazana je na slici 2.



**Slika 2.** Filogenetsko stablo bazirano na temelju sekvencijalne analize 16S rRNA. Vrste čiji genomi su izlorani do siječnja 2008. obilježeni su crvenim pravokutnicima (Anonymous 2, 2009).

**1.3.2 Primjena bakterija mliječne kiseline**

Bakterije mliječne kiseline industrijski su važni organizmi prepoznati radi fermentativne sposobnosti kao i zdravstvenih i nutricionističkih pogodnosti koje donosi njihova konzumacija (Rattanachaikunsopon i Phumkhachorn, 2010). Fermentirana hrana proizvedena uz pomoć BMK od velikog je značaja za zdravlje ljudi i životinja. Tu spadaju proizvodi poput kefira, jogurta, kiselog vrhnja te sira. BMK imaju, također, važnu ulogu u proizvodnji kruha, posebice raženog kruha. Još neki proizvodi dobiveni koristeći BMK jesu i neke vrste kobasica, masline, kiselo zelje te kiseli krastavci. Ove bakterije stupaju u interakciju sa stanicama epitela probavnog sustava te značajno utječu na funkciju probavnog sustava čovjeka, a neki sojevi proizvode bakteriocine odnosno spojeve s antimikrobnom aktivnošću (Halasz, 2009). Posljedice interakcije sa epitelom probavnog sustava manifestiraju se u vidu smanjenja problema vezanih za sindrom iritabilnog crijeva, ublažavanja virusne i lijekovima izazvane dijareje, obnovljanja normalne intestinalne flore, stimulacije nespecifične imunosti i humoralnog imuniteta, smanjenja intolerancije na laktozu, olakšavanja liječenja čira na želucu i dr. (Masood i sur., 2011).

**1.4 *Lactobacillus plantarum***

*Lacotbacillus plantarum* je bakterijska vrsta u velikoj i genetički različitoj skupini roda *Lactobacillus* koja sadrži više od sto imenovanih vrsta. *L. plantarum* spada u skupinu fakultativno heterofermentativnih bakterija. Ono po čemu se *L. plantarum* razlikuje od ostalih vrsta roda *Lactobacillus* je relativno veliki genom što omogućava prilagodbu na širok spektar uvjeta. Može fermentirati različite izvore ugljika, u mogućnosti je akumulirati visoke koncentracije mangana u stanicama čime osigurava obranu od kisikovih radikala jer ih reducira u vodikov peroksid. Vodikov peroksid potom se prevodi u vodu i kisik uz aktivnost magan ovisne pseudokatalaze. *L. plantarum* može preživjeti u vrlo kiselim uvjetima (pH<4) te pokazuje tanaznu aktivnost (Molin, 2001).

Ljudski gastrointestinalni sustav sastoji se od kompleksnog mikrobnog ekosustava kojeg čini nekoliko stotina različitih bakterijskih vrsta, a jedna od njih je i *Lactobacillus plantarum*. Postoje dva pristupa za povećanje broja korisnih mikroorganizama u gasrtointestinalnom sustavu. Oralno uzimanje živih, korisinih mikroorganizama je prvi pristup. Ti mikroorganizmi su nazvani probiotici, a definiraju se kao jedna ili više kultura živih mikroorganizama koje, primjenjene u ljudi ili životinja, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore. Probiotici potječu uglavnom iz skupina bakterija koje se zovu bakterije mliječne kiseline i bifidobakterije koje inače čine normalnu intestinalnu mikrofloru ljudi. Drugi pristup povećanja probiotika, ima za svrhu sprečavanje sniženja njihova udjela u ukupnoj crijevnoj mikroflori. Tako se u prehranu uvode selektivni izvori ugljika i energije koji im osiguravaju kompetetivnu prednost pred drugim bakterijama u ekosustavu. Budući da ljudsko crijevo sadrži visoku koncentraciju bakterija, pretpostavlja se, da se izvor ugljika i energija potrebna za održavanje tako velike bakterijske biomase može dobiti iz ugljikohidrata u izlučevinama „domaćina“ ili iz ugljikohidrata koji nisu probavljivi u tankom crijevu. Ove selektivne, hranjive tvari nazivaju se prebiotici, a definiraju se kao neprobavljivi sastojci hrane koji korisno djeluju na domaćina pomoću selektivne stimulacije rasta i/ili aktivnosti jedne bakterijske vrste ili ograničenog broja bakterijskih vrsta u debelom crijevu i tako poboljšavaju zdravlje ljudi (Šušković i sur., 2003).

**1.5 Bakterije roda *Salmonella***

Rod *Salmonella* usko je povezan s rodom *Esherichia*, a čine ga gram negativne, nesporogene, štapićaste bakterije iz obitelji *Enterobacteriaceae,* trivijalnog naziva enterobakterije. Veličina ovih bakterija u promjeru je od 0,7-1,5 μm, duljine 2-5 μm (Fàbrega i Vila, 2013). Bakterije roda *Salmonella* jedne su od istraženijih patogenih bakterijskih vrsta koje se vodeći uzrok gastoenteritisa i tifusa u ljudi i nekih životinja. Izvor zaraze najčešće je konzumacija mikrobno onečišćene hrane ili vode. Infektivna doza kod koje dolazi do oboljenja iznosi 105 do 106 varijabilnih stanica koje su sposobne proizvoditi endotoksin (Xu i sur. 2013). Spadaju u intracelularne bakterije koje napadaju te se repliciraju i rastu unutar epitelnih stanica i makrofaga (Mitev i sur. 2009).

**1.5.1 *Salmonella enterica***

Mikroorganizmi iz roda *Salmonella* su fakultativni aerobi i primarno su unutarstanični patogeni koji uzrokuju različite infekcije u ljudi. Rod *Salmonella* uključuje dvije vrste: *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori*, a obje su patogene za čovjeka (Barbau-Piednoir i sur., 2013). Često se koriste skraćeni nazivi, npr. "*Salmonella typhimurium*", međutim njezin službeni naziv je *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotip *Typhimurium* (Cianflone, 2008).

Identifikacija serotipizacijom somatskih (O) i flagelarnih (H) antigena među prvima je korištena za klasifikaciju *Salmonella* sp., pri čemu se u početku svaki serotip smatrao različitom vrstom. Međutim, antigeni s površine stanica ponekad se prenose horizontalno i to može uzrokovati klasifikaciju genetički nepovezanih sojeva u isti serotip. Unutar *S. enterica* vrste dodatno je klasificirano šest podvrsta, tj. serotipova: *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV), *salamae* (II), *indica* (VI) i *enterica* (I). Sojevi *S. enterica* subsp. *enterica* (I) predstavljaju većinu sojeva *Salmonella* izoliranih iz ljudi i toplokrvnih životinja, dok su ostale podvrste kao i *S. bongori* većinom (ali ne i isključivo) izolirani iz hladnokrvnih životinja. Oko 50 od ~2600 poznatih serotipova *Salmonella* izolirano je kao 99% uzročnika salmoneloze u ljudi i domaćih životinja, a svi su dio podvrste *enterica* (Desai i sur., 2013).

**1.5.2 Salmoneloza**

*Salmonella* može kolonizirati gastrointestinalni trakt ljudi i životinja te tako uzrokovati infekcije. Neke vrste više su prilagođene rastu u ljudskom organizmu, a neke u životinjskom. *S. typhy*, na primjer, prenose samo ljudi, dok netifoidni serotip *S. dublin* pogađa uglavnom stoku. Najčešće identificirani serotipovi su *S. typhimurium*, *S. enteritidis* i *S. newport*. Procjenjuje se da se godišnje oko 93,8 milijuna ljudi zarazi salmonelom te da oko 155 000 ljudi umre od te bolesti. Do zaraze kod ljudi, u više od 95% slučajeva, dolazi zbog konzumiranja kontaminirane hrane, posebice jaja, mesa peradi, goveda ili mliječnih proizvoda. Najčešće zaraze putem vode su kontaminirane rijeke, te nedostatna higijena ruku nakon kontakta sa zaraženim životinjama. Bolest se kod ljudi javlja samo kada u crijeva dođe velika količina salmonele, dok malu količinu bakterija uništava prirodna crijevna flora. Blaži oblik bolesti uzrokuje *S. enterica* serotip *enteridis* i ona se očituje mučninom i grčevima u trbuhu, nakon čega slijedi proljev, vrućica, a ponekad i povraćanje. Teže oblike trbušnog tifusa uzrokuje *S. enterica* serotip *typhimurium*, koja može izazvati i smrt bolesnika (Cianflone, 2008).

**1.6 Adhezija bakterijskih stanica na humane stanice epitela**

Uspostava mikrobnog biofilma je složen proces koji počinje kada planktonske bakterijske stanice uspostave kontakt s površinom i pričvrste se za nju. Nakon pričvršćivanja na površinu (i međusobno), bakterije se dodatno prilagođavaju načinu života u biofilmu tako što sazrijevanju i formiraju složenu trodimenzionalnu strukturu. Metabolizam i ekspresija gena razlikuju se tijekom različitih faza formiranja biofilma. Različiti okolišni čimbenici (poput prisutnosti nutrijenata, metabolizma domaćina, fizikalnih i kemijskih svojstava koloniziranih površina, koncentracije soli i osmolarnosti), kao i signali koje sama bakterija proizvodi (indol, acetil fosfat, N-acil homoserin lakton) igraju ulogu u uspostavljanju, sazrijevanju i raširenosti biofilma (Teplitski i sur., 2006). Nakupljanje signalnih molekula u okolišu omogućuje svakoj pojedinoj bakterijskoj stanici procjenu stanične gustoće, odnosno ukupnog broja bakterija, a ta se pojava naziva detekcija kvoruma (*engl*. quorum sensing). Koncentracija signalnih molekula postignuta pri točno određenoj, kritičnoj gustoći stanica, postaje dovoljna za aktivaciju gena uključenih u sintezu faktora virulencije ili sekundarnih metabolita. Sazrijevanje biofilma odvija se u pet razvojnih stadija. Prvi stadij je reverzibilno povezivanje, u kojem se planktonske stance tek kratkotrajno povezuju sa supstratom, a nakon toga slijedi drugi stadij, ireverzibilno povezivanje, u kojem se planktonske stanice čvrsto vežu na površinu supstrata i gube svojstvo pokretljivosti. Treći stadij čini prvo sazrijevanje za koje je karakteristično stvaranje izvanstaničnog matriksa, te povećavanje i višeslojnost mikrokolonija. Mikrokolonije, najčešće gljivolikog ili stupićastog izgleda, svoju maksimalnu veličinu dosežu u stadiju drugog sazrijevanja. Proces sazrijevanja biofilma završava petim stadijem, disperzijom, u kojem se između mikrokolonija formiraju vodeni kanalići, a same mikrokolonije mijenjaju svoj oblik u školjkasti, uslijed izdvajanja bakterijskih stanica smještenih u središnjem dijelu mikrokolonija u potrazi za novim i boljim izvorom hranjivih tvari. Biofilm može činiti samo jedna bakterijska vrsta, no češće se sastoji od više vrsta bakterija, ili bakterija i gljiva. Jednom pričvršćeni za površinu, mikroorganizmi biofilma mogu svojim aktivnostima doprinositi ili štetiti zbivanjima u okolišu, ovisno o uvjetima koji u njemu vladaju (Vraneš i Leskovar, 2009).



Slika 3. Glavne faze formiranja bakterijskog biofilma: 1) Reverzibilno vezanje; 2) Ireverzibilno vezanje; 3) Maturacija I; 4) Maturacija II; 5) Disperzija (prilagođeno prema Anonnymous 3, 2015)

**1.6.1 Adhezija *S. enterica* na HEp2 stanice**

Ovisno o serotipu i životinjskoj vrsti koju napada, bakterije iz roda *Salmonella* mogu preživjeti i replicirati se unutar makrofaga te širiti do limfnih čvorova u mezenteriju, slezene i jetre (Zhang i sur., 2003). Salmonelakoja uzrokuje trbušni tifus može preživjeti unutar ljudskog domaćina formiranjem biofilma na površini žučnih kamenaca, a to bi moglo objasniti neuspješnost antibiotskih tretmana. Uzročnik netifoidne salmonelozetakođer može kolonizirati žučne kamence u laboratorijskim uvjetima, a osim toga može formirati i biofilm na HEp2 stanicama koje su suspendirane u mediju za uzgoj (Boddicker i sur., 2002). Osim formiranja biofilma na različitim biotičkim površinama u laboratorijskim uvjetima, u prirodnom okruženju bakterije iz roda *Salmonella* tvori biofilmove na biljnim i abiotičkim površinama, uključujući plastiku, metal i staklo. Bakterije roda *Salmonella* čine značajan udio prirodnih mješovitih vrsta izoliranih iz biofilma unutar cijevi vodoopskrbe (Schmeisser i sur., 2003). To svojstvo da opstanu i razmnožavaju se unutar biofilma, izvan životinjskog domaćina, može objasniti postojanost ove bakterije kao jednog od glavnih uzročnika bakterijskog gastroenteritisa.

Kao ključni faktor uspostavljanja biofilma *S. enterica* serotip *Tiphymurium* smatra se FimH adhezin, koji se nalazi na vrhu tipa 1, manoza-senzitivnih fimbrija. Ovaj adhezin veže manozilirane ostatke čime otpočinje signalnu kaskadu u domaćinovim epitelnim stanicama, što rezultira lokaliziranim preslagivanjem aktina, te uvlačenjem adherirane bakterije u stanicu. Međutim, nedavna istraživanja su pokazala da se prirodno pojavljuju manje razlike u FimH adhezinima u različitim sojevima *S. enterica* serotip *Typhimurium*, što može rezultirati drastičnim razlikama u mogućnosti vezanja ove bakterije za stanice sisavaca. Npr. FimHSL1344 razlikuje se od FimHLB5010 u samo dvije amino skupine, a bakterije koje eksprimiraju FimHLB5010, rasle su u debelom sloju kad su bile vezane na monosloj HEp2 stanica, za razliku od bakterijskih stanica koje su eksprimirale FimHLB5010 i rasle su u tankom sloju vezane na HEp2 stanice (Kisiela i sur., 2011).

Dvokomponentni BarA/SirA sustav je globalni regulator virulencije, pokretljivosti i formiranja biofilma. Dokazano je da BarA/SirA sustav regulira *fim* operon čiji geni kodiraju za fimbrije tipa I koji imaju važnu ulogu u formiranju biofilma kod *Salmonella* sp. SirA sustav djeluje na povećanu ekspresiju tipa I fimbrija, a smanjenu ekspresiju flagela (bičeva) koji su potrebni za pokretanje bakterijskih stanica. Kao posljedica toga, dolazi do pričvršćivanja bakterijskih stanica za čvrstu površinu ili za neke druge stanice (Teplitski i sur., 2006).

**1.6.2 Adhezija laktobacila na humane stanice epitela**

Sposobnost adhezije je bitan preduvjet za kolonizaciju probiotičkih sojeva u gastrointestinalnom traktu.U *in vivo* uvjetima, površine epitelnih stanica su gusto prekrivene autohtonom mikroflorom, koje su fizička barijera nadolazećim bakterijama da adheziraju površinu epitelnih stanica. Kolonizacija poželjnih probiotičkih sojeva spriječava kolonizaciju štetnih patogenih bakterija, te se time smanjuje njihov broj (Frece i sur. 2010). Svojstvo laktobacila za vezanje na epitelne tumorske stanice debelog crijeva (Caco-2), prilično varira među sojevima što pokazuje da svojstva adhezije nisu univerzalna među različitim sojevima laktobacila (Chauviere i sur., 1992). S-sloj prekriva staničnu stijenku bakterija i sastoji se od proteinskih podjedinica (koje mogu biti glikozilirane), organiziranih u kristalni heksagonalni ili tetragonalni sloj. Greene i Klaenhammer (1994) dokazali suda S-sloj djeluje kao adhezin odnosno da služi pri adheziji stanica na crijevnu sluznicu. U nekim sojevima vezanje ovisi o prisutnosti dvovalentnih iona kalcija, dok se kod nekih odvija neovisno o prisutnosti kalcija (Chauviere i sur., 1992). Također, laktobacili se na epitelne stanice vežu ovisno o pH, koncentraciji i fazi rasta bakterijskih stanica. Porastom pH vrijednosti kao i koncentracijom živih stanica laktobacila, raste i broj vezanih stanica na Caco-2 stanice (Bogovič Matijašić i sur., 2003;).

**1.7 Analitičke metode**

Analiza i sinteza spadaju među najranije otkrivene i upotrebljavane metode u znanstvenoj spoznaji. Analizom u užem smislu nazivamo raščlanjivanje tvorevina na njihove elemente.Postoji mnogo definicija analize. Jedna od njih je da je analitička metoda postupak pri kojem se putem razlaganja,razdvajanja itd., djelatnost subjekta postepeno razvija od neke kompleksne cjeline, kao polazne točke istraživanja, k iznalaženju i utvrđivanju elemenata i sadržaja,nekog objekta i odnosa tih elemenata u njemu (Anonnymous 4, 2015).

**1.7.1 Analiza organskih kiselina**

Za analizu organskih kiselina često se koriste kromatografske metode. Kromatografija se zasniva na različitoj raspodjeli otopljene tvari između pokretne i nepokretne faze tijekom prolaska kroz kromatografsku kolonu. Kromatografske metode se prema fizičkom stanju faza dijele na tekućinsku, plinsku i superkritičnu kromatografiju (Settle, 1997). Za određivanje prisutnosti i koncentracije organskih kiselina u uzorku upotrebljavaju se tekućinska kromatografija-LC, tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti-HPLC i plinska kromatografija-GC (Cocchi i sur., 2002).

**1.7.2 Tekućinska kromatografija**

Kromatografija je metoda razdvajanja sastojaka smjese na temelju različite raspodjele sastojaka između pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne) faze. Tekućinska kromatografija (eng. Liquid Chromatography, LC) sadrži tekuću mobilnu fazu. Kromatografska razdvajanja suspenzija temelje se na reakcijama između funkcionalnih grupa topivih molekula i stacionarne faze. Interakcije prisutne prilikom tekućinskih kromatografija su vodikove veze, Wan der Waalsove interakcije i elektrostatska privlačenja, a tip tekućinske kromatografije ovisi o prirodi tih interakcija. Izbor metode tekućinske kromatografije najviše ovisi o molekulskoj masi, ionskom karakteru i polarnosti otopljene tvari (Mansoor, 2002).

**Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti**

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng**.** High Performance Liquid Chromatography, HPLC) razvijena je u drugoj polovici dvadesetog stoljeća. Danas je široko primijenjena separacijska metoda za analizu različitih vrsta analita, a koristi se i za pročišćavanje u različitim područjima uključujući farmaceutsku, biotehnološku, ekološku, polimernu i prehrambenu industriju. Nedavna područja usavršavanja ove tehnike uključuju minijaturizaciju HPLC sustava, primjenu u analizi nukleinskih kiselina, neoštećenih proteina i probavljenih proteina, analizi ugljikohidrata i kiralnoj analizi. Za analizu HPLC uzorci moraju biti u tekućem stanju.

Ovisno o primijenjenom sustavu volumen injektiranja uzorka varira (1-10 μL). Vrijeme analize pojedinog uzorka ovisno o metodi može trajati od 5 minuta pa sve do 2 sata. Ograničenja metode HPLC su: identifikacija spoja može biti otežana ako HPLC nije povezan sa spektrometrijom masa; razlučivost je teško postići u kompleksnim uzorcima; ne može se analizirati više uzoraka istovremeno; za optimizaciju separacije potrebno je znanje i iskustvo rada na instrumentu; vrijeme analize može biti dosta dugo i često je potrebna prethodna priprema uzorka (Settle, 1997).

**Princip rada tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti**

HPLC se sastoji od osam važnih komponenata: pokretne faze, pumpe, uređaja za unošenje uzorka, kolone, detektora, posude za otpad, računala, integratora ili pisača (Settle, 1997). HPLC se sastoji od injektiranja male količine tekućeg uzorka u pokretnu fazu koja prolazi kroz kolonu s punilom što čini mobilnu fazu. Razdvajanje smjese na sastavne komponente ovisi o različitom vremenu zadržavanja (retencijsko vrijeme) svakog spoja u koloni. Dužina zadržavanja nekog spoja u koloni ovisi o njegovoj raspodjeli između tekuće mobilne faze i stacionarne faze. Prilikom izvođenja mjerenja pomoću metode HPLC na raspodjelu spojeva utječu interakcije koji određeni spoj uspostavlja sa stacionarnom fazom i mobinom fazom. Uzorak se u kolonu unosi ručno ili ukoliko se radi o suvremenijem uređaju automatski. Mobilna faza prolazi kroz stacionarnu tako da se s njom ne miješa, a izbor faza ovisi o uzorku kojeg ispitujemo budući da u svakoj fazi mora biti različita topljivost. Eluiranje ili separacija spojeva proizlazi iz različite pokretljivosti sastavnica uzorka. Brzina kojom se uzorak kreće kroz kolonu ovisi o njegovom vremenu zadržavanja u pokretnoj fazi. Vrijeme provedeno od trenutka injektiranja uzorka do trenutka izlaska iz kolone i detektiranja naziva se retencijsko vrijeme ili vrijeme zadržavanja (McPolin, 2009). HPLC je često korištena metoda za kvantitativne analize, dok za uzorke nepoznatog sastava često se upotrebljava HPLC sparen sa masenom kromatografijom (HPLC-MS) potom se maseni spektar određenog ili svih pikova u kromatogramu uspoređuje sa spektrima pohranjenim u računalnom sustavu. HPLC-MS sustavi su kompleksni i skupi. HPLC nam omogućuje razdvajanje organskih, anorganskih, termolabilnih, bioloških spojeva ipolimera te njihovu kvalitativnu ili kvantitativnu analizu. Često se koristi za mjerenje koncentracije aktivnih droga, sintetskih proizvoda, pesticida i insekticida. Do ograničenja primjene metode HPLC dolazi prilikom kvantitativnih analiza ukoliko HPLC nije sparen sa masenom spektrometrijom i rezolucija je loša u kompleksnim uzorcima (Anonnymus 5, 2014).

**Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti**

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (eng. Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) je relativno nova tehnika koja daje nove mogućnosti u primjeni tekućinske kromatografije, posebno što se tiče smanjenja vremena rada i potrošnje otapala. UPLC kromatografski sustav osmišljen je na poseban način, tako da može izdržati visoki sistemski podtlak (Novakova i sur., 2006).

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti pokazuje veću djelotvornostod HPLC-a. UPLC rabi manje (<2 µm) čestice punilakolone i njezine dimenzije omogućuju uporabu višihtlakova (do 96 MPa). Stoga UPLC pokazuje boljerazlučivanje, brže analize i poboljšanu osjetljivostodređivanja u usporedbi s HPLC-om (Klinčić i Herceg-Romanić, 2011).

**1.8. Proteomika**

Pomoću metoda proteomike moguće je razjasniti mehanizme koji se odvijaju na razini stanice, otkriti proteine biomarkere, mete za razvoj novih metoda i potencijalnih terapeutika. Kako je karakterizacija proteoma na molekularnoj razini vrlo važna za razumijevanje bioloških sustava, tako se razvila proteomika sa svrhom da upotpuni istraživanje genoma. Proteomika ima veliki potencijal u medicini, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji te biologiji i ostalim prirodnim zanostima (Kraljević Pavelić, 2009; Kersey i sur., 2004).Proteomika je područje u kojem se proučavaju proteini. Područje proteomike teži proučavanju strukture i funkcije proteina, protein- protein, protein- nukleinska kiselina, protein- lipid i enzim- supstrat interakcija, post translacijske modifikacije, procesiranja i smatanja proteina, alternativne izoforme uzrokovane alternativnim „splicingom“ i iskorištenjem promotora. Mogućnost detektiranja i uspoređivanja navedenih pojava između dva događaja u stanici je esencijalno za razumijevanje staničnih odgovora. Kako bi se potkrijepila činjenica kompleksnosti ovog područja, sve podatke dobivene proteomikom je potrebno povezati i uskladiti s ostalim informacijama kao što su pripadajući geni, mRNA, metaboliti i tek onda će biti u potpunosti moguće razumjeti kako neki sustav funkcionira (Weston i Hood, 2004).

**1.8.1 Tehnike razdvajanja i analize proteina**

Postupak izdvajanja proteina je težak jer su proteini osjetljivi i lako se denaturiraju. Za razdvajanje koriste se metode koje razdvajaju proteine na temelju njihove veličine (gel filtracija, ultracentrifuga, SDS gel elektroforeza), naboja (kromatografija na ionskim izmjenjivačima, izoelektrično fokusiranje, gel elektroforeza) i na temelju specifičnih veza s određenim molekulama-ligandima (afinitetna kromatografija). Najčešće korištene su kromatografske i elektroforetske metode (Burgess i Deutscher, 2009).

**1.8.1.1 Spektrometrija masa**

Spektrometrija masa (SM) postala je iznimno važna tehnika u analizi biološki važnih makromolekula. Točno određivanje mase peptida ili proteina omogućuje identifikaciju proteina, određivanje aminokiselinskog slijeda, identifikaciju posttranslacijske modifikacije (glikolizacija, nastajanje disulfidnih mostova, fosforilacija itd.), određivanje mutacije te provjeru strukture i čistoće proteina dobivenih genetičkim inženjeringom. SM se primjenjuje i u istraživanju razlučitih interakcija između proteina i iona metala, malih organskih molekula i različitih bioloških spojeva. Određuje se stehiometrija nastalih nekovalentnih kompleksa, afinitet i konformacijske promjene povezane s navedenim interakcijama (Galić i Cindrić, 2008).

**Ionski izvori (ionizacijske komore)**

Ionski izvori u spektrometru masa je stvaraju ione u plinovitoj fazi. Analiti, molekule ili klasteri se prevode u plinsku fazu i ioniziraju ili istovremeno ili kroz zasebne procese (Ekman i sur., 2009). Ionski izvori služe za ionizaciju kemijskih spojeva. U spektrometriji masa analit nakon ionizacije ulazi u analizator masa. Postoji više različitih izvedbi ionskih izvora. Neke od njih su: desorpcija poljem (*engl.* Field desorption, FD), desorpcija i ionizacija elektroraspršenjem (*engl*. Desorption electro spray ionization, DESI), direktna analiza u realnom vremenu (*engl*. Direct analysis in real time, DART), ionizacija elektroraspršenjem (*engl.* Electro spray ionization, ESI), fotoionizacija pri atmosferskom tlaku (*engl*. Atmospheric pressure photoionization), ionizacija električkim pražnjenjem (*engl*. Glow discharge), induktivno spregnuta plazma (*engl*. Inductively coupled plasma, ICP), ionizacija elektronima (*engl*. Electron ionization, EI), ionizacija prihvatom iona (*engl*. Ion-attachment ionization), ionizacija iskrom (*engl*. Spark ionization), kemijska ionizacija (*engl*. Chemical ionization, CI), kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (*engl*. Atmosphericpressure chemical ionization, APCI), matricom pomognuta laserska desorpcija i ionizacija (*engl*. Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI), matricom pomognuta laserska desorpcija i ionizacija elektroraspršenjem (*engl*. Matrix-assisted laser desorption electrosprayionization, MALDESI), mikrovalno inducirana plazma (*engl*. Microwave induced plasma), ionizacija termoraspršenjem (*engl*. Thermospray ionization), udar ubrzanim atomima (*engl*. Fast atom bombardment, FAB), ionizacija nadzvučnim raspršenjem (*engl*. Sonic spray ionization) (Benčić i Cindrić, 2009). MALDI i ESI su najčešće korištene ionizacijske tehnike za spektrometrijsku analizu bioloških molekula kao što su proteini i peptidi (Aebersold i Mann, 2003).

Ionizacija MALDI razvijena je 1988. godine. Sama tehnika se temelji na desorpciji analita prethodno ugrađenog u kristalnu strukturu molekula matrice koja služi kao nosač za ione koji trebaju biti generirani iz polarnih ili nabijenih molekula uzorka. Nakon što laserski puls svoju energiju zračenja, najčešće valne duljine u UV području matrice, preda matrici, dolazi do njenog naglog zagrijavanja jer molekule matrice apsorbiranu energiju zračenja oslobađaju u obliku topline. Najčešće upotrebljavane tehnike za pripremu uzoraka za MALDI analizu su metoda sušene kapljice, metoda tankog sloja te tzv. sendvič metoda (Rožman, 2003).

**Analizator masa**

U analizatoru masa ioni se razdvajaju prema omjeru mase i naboja (*m/z*). Nekoliko je različitih vrsta analizatora masa, ovisno o principu na kojem razdvajaju ione prema *m/z*, ali svi analizatori koriste statičko ili dinamičko električno polje i magnetsko polje. Ta polja mogu biti samostalna ili kombinirana. Najbitnija razlika između analizatora masa je ta koje polje koriste za razdvajanje iona. Tipovi analizatora koji se koriste u MS su: analizator s električnom sektorom, analizator s magnetskim sektorom, kvadrupol (*engl*. Quadropole), ionska stupica (*engl*. Ion Trap), analizator koji mjeri vrijeme leta (*engl*. Time-of-Flight) i analizator ionsko ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju (*engl*. Fourier Transform Ion Cyclotron Reasonance, FT ICR) (El-Aneed i sur., 2009).

Tehnikom MALDI uglavnom nastaju jednostruko nabijeni ioni. Budući da se radi o pulsnoj tehnici, najčešće se povezuje s analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta (TOF), ali je moguće i povezivanje s analizatorima koji skladište ione, primjerice ionska stupica ianalizator ionsko-ciklotronske rezonancije koji koristi Fourierovu transformaciju. Biološki uzorci obično su razrijeđene otopine peptida ili proteina i onečišćenja (nehlapljivi puferi, deterdženti, soli itd.) koja mogu smanjiti ili potpuno prigušiti intenzitet željenog iona. Tehnika MALDI-TOF je iznimno osjetljiva i ima veliku brzinu analize (moguće je analizirati oko 100 uzoraka u 10 min) te nije osjetljiva na otapala. Ako se uzorci analiziraju u linearnom načinu snimanja, moguće je detektirati prosječne mase i preko 200 000 Da, dok je kod snimanja uz ionsko zrcalo gornja granica masa oko 20 000 Da. U posljednjih nekoliko godina tehnika MALDI-TOF analiza je unaprijeđena dodatkom još jednog analizatora masa, pa se tako ta tehnika naziva MALDI-TOF/TOF. Tandemna spektrometrija masa se kod analizatora TOF/TOF provodi selekcijom iona u prvom TOF-analizatoru, cijepanjem iona prekursora u kolizijskoj ćeliji, koja se nalazi između prvog i drugog analizatora te snimanjem nastalih fragmenata drugim TOF-analizatorom (Galić i Cindrić, 2008).

**Detektori**

Ioni se kroz analizator masa detektiraju i pretvaraju u električni signal pomoću detektora. Detektori iz dolaznih iona generiraju električnu energiju koja je proporcionalna njihovoj brojnosti. Postoji nekoliko vrsta detektora koji koriste različite pristupe za detektiranje iona. Međutim, ta detekcija uvijek se temelji na naboju, masi ili brzini iona. Prvi detektori su koristili fotografske ploče koje se nalaze iza analizatora. Takvi detektori, koji omogućuju istovremenu detekciju velikog raspona *m/z*, upotrebljavani su dugi niz godina, ali danas su zastarjeli. U novije vrijeme najčešće se koriste elektro-optički detektor i multiplikator elektrona (Hoffmann i Stroobant, 2007).

**1.9 Identifikacija proteina**

Nakon spektrometrije masa, proteini se identificiraju uz pomoć proteinskih baza podataka. Najčešće se radi usporedba mase proteina dobivenih eksperimentalno s masom proteina koji su pohranjeni u bazama podataka. Baze podataka možemo pretraživati pomoću tri metode: metoda „pretraga“ iona MS/MS, metoda otiska prsta mase peptida (*engl.* Peptide Mass Fingerprinting, PMF) i metoda „upita“ sekvence (*engl.* Sequence Query). Metoda „upita sekvence“ u kojoj su molarna masa jednog ili više peptida u kombinaciji sa sekvencom, sastavom peptida i podacima ionskih fragmenata, ima potencijal da bude najmoćniji alat zapretragu i identifikaciju proteina. Metoda „otiska prsta“ mase peptida temelji se na usporedbi peptida dobivenih eksperimentalno s masama peptida dobivenih teoretskim cijepanjem svih proteina koji se nalaze u bazi podataka. MS/MS metoda identifikacije proteina je slična metodi „otiska prsta“ jer se temelji na usporedbi eksperimentalno dobivenih MS/MS spektara s onima koji su teoretski dobiveni od svih peptida u bazi podataka (Perkins i sur., 2009).

Osim pretrage proteinskih baza, postoji još jedan način identifikacije proteina, sekvencioniranje *de novo*. U ovoj metodi se podaci o sekvenci peptida iščitavaju iz MS/MS spektra te se takva sekvenca dalje uspoređuje s podacima u banci podataka. No, nakon fragmentacije peptida sekvencioniranjem *de novo* dobiju se komplicirani spektri koje nije lako interpretirati. Postoje mnogi softverski programi za automatsko sekvencioniranje *de novo* kao što su Peaks, Lutefisk, Sherenga, PepNovo i dr. (Ma i sur., 2003).

Metoda kemijski aktivirane fragmentacije negativ/kemijski aktivirane fragmentacije pozitiv (*engl*. chemically activated fragmentation negative/chemically activated fragmentation positive) se bazira na dodavanju sulfonilne skupine na N-kraj peptida, čime N-kraj peptida postaje negativno nabijen. To omogućava fragmentaciju peptidnih iona na peptidnoj vezi i snimanje spektra MS/MS u dva načina rada spektrometra masa, pozitivnom i negativnom. Ovom metodom MS/MS spektar se pojednostavljuje zbog toga što se u negativnom spektru MS/MS vide samo ioni serije y, a u pozitivnom MS/MS spektru vide se samo ioni serije b, što olakšava sekvenciranje peptida *de novo*. Sekvence peptida pozitivnog i negativnog spektra se mogu poklopiti, a time se dobije sekvenca peptida koja daljnom pretragom proteinskih baza identifikaciju proteina čini jednostavnijom (Cindrić i sur., 2010).

2**Hipoteza i/ili Opći i specifični ciljevi rada**

S obzirom da su bakterije iz roda *Lactobacillus* poznate probiotičke bakterije koje imaju brojne utjecaje na ljudski organizam pretpostavlja se da imaju značajan utjecaj na promjenu ekspresije niza proteina nakon što dođe do vezanja ovih bakterija za epitel humanih stanica. Pretpostavka je i da u prisustvu patogenih bakterija mogu modulirati intenzitet i djelovanje patogena na epitelne stanice. Ovim radom želimo dokazati da bakterija *Lactobacillus plantarum* ima značajan učinak na intenzitet vezanja patogene bakterije *Salmonella enterica*, te da vezanjem dolazi promjena u metabolizmu humanih epitelnih stanica te promjena na razini ekspresije različitih proteina uključenih u stresni *I* imunološki odgovor.

Cilj ovog rada je utvrditi utjecaj patogene enterobakterije iz roda *Salmonella* i nepatogenih bakterija *Lactobacillus plantarum* na metabolizam i ekspresiju proteina humanih stanica HEp2.

Stoga će se istražiti kompeticijsko djelovanje enterobakterije i laktobacila na epitelne humane stanice HEp2. Napraviti će se analiza organskih kiselina metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti, a razlika u ekspresiji proteina humane stanične linije carcinoma grkljana nakon tretmana sa bakterijskim sojevima biti će identificirani tandemnom spektrometrijom masa (MS/MS) u pozitivnom načinu rada.

3**Materijali i metode**

3.1 MATERIJALI

**3.1.1 Bakterijski sojevi**

U eksperimentalnom radu korišteni su bakterijski sojevi *Lactobacillus plantarum* 16.4 (*L.p.* 16.4), izoliran iz autohtonog hrvatskog prehrambenog proizvoda i *Salmonella enterica* serotip *Typhimurium* LT21 (LT21). Sojevi su čuvani u 50%-tnom glicerolu na temperaturi -70° C kao trajne kulture.

**3.1.2 Humane tumorske stanice**

Uz navedene bakterijske sojeve u eksperimentalnom radu korištene su i roditeljske ljudske stanice karcinoma grkljana HEp2. Stanice HEp2 rasle su kao jednoslojna kultura u kompletiranom mediju (DMEM+10% FBS (*foetal bovine serum*).

**3.1.3. Hranjive podloge i puferi za uzgoj bakterijskih stanica**

Korištene hranjive podloge u radu su kompletna podloga (MRS, čvrsta), Simmonsov citratni agar kao selektivna podloga za rast bakterije *S. enterica* i kompletna podloga s nalidiksinskom kiselinom kao selektivna podloga za rast bakterije *L. plantarum.* Navedene podloge pripremljene su prema uputama proizvođača i sterilizirane u autoklavu pri temperaturi 121° C u trajanju od 15 minuta i pri tlaku od 1.01x 105 Pa. U sve podloge dodan je agar prije sterilizacije.

Kompletna podloga (*engl*. De Man, Rogosa and Sharpe broth, MRS)

MRS je kompletna hranjiva podloga pogodna za uzgoj bakterija iz roda *Lactobacillus,* jer u svom sastavu sadrži faktore rasta za laktobacile, ali i inhibitore kompetitivnih mikroorganizama. Koristi se u tekućem ili krutom obliku i u tom se slučaju prije sterilizacije dodaje 20g agara po litri podloge.

Tablica 1. Sastav MRS hranjive podloge

|  |  |
| --- | --- |
| **SASTOJAK** | **KOLIČINA** |
| Glukoza | 20 g |
| Mesni ekstrakt | 10 g |
| Kvaščev ekstrakt | 10 g |
| Kazein hidrolizat | 10 g |
| Kalijev hidrogenfosfat | 5 g |
| Natrijev acetat | 2 g |
| Amonijev citrat | 2 g |
| MgSO4 x 7 H2O | 0,1 g |
| MnSO4 x 4 H20 | 0,05 g |
| Tween 80 | 1 mL |
| Destilirana voda | do 1000 mL |

Selektivna podloga za rast bakterije *S. enterica* (Simmonsov citratni agar)

Simmonsov citratni agar se koristi kao selektivna podloga za rast bakterija koje metaboliziraju citrat. Podloga je pripremljena prema uputama navedenim u tablici 2.

Tablica 2. Sastav selektivne podloge Simmonsovog citratnog agara

|  |  |
| --- | --- |
| **SASTOJAK** | **KOLIČINA** |
| NH4H2PO4 | 1 g |
| K2HPO4 | 1 g |
| NaCl | 5 g |
| Natrij citrat | 2 g |
| Na2SO4 | 0,2 g |
| Agar | 15 g |
| Bromtimolno modrilo | 0,08 g |
| Destilirana voda | do 1000 mL |

Selektivna podloga za bakteriju *L. plantarum*

Podloga je pripremljena na isti način kao i čvrsta kompletna podloga (MRS), a nakon sterilizacije dodan je volumen od 300 $μ$L osnovne otopine nalidiksinske kiseline koncentracije 100 mg mL-1 u ohlađenu podlogu. Konačna koncentarcija nalidiksinske kiseline iznosi 30 $μ$L mL-1 podloge.

Fosfatni pufer

Fosfatni pufer pripremljen je prema uputama u tablici 3.

Tablica 3. Sastav fosfatnog pufera (PBS)

|  |  |
| --- | --- |
| **SASTOJAK** | **KOLIČINA** |
| NaCl | 8 g |
| KCl | 0,2 g |
| Na2HPO4 x 2H20 | 0,15 g |
| K2HPO4 | 0,2 g |
| Destilirana voda | do 1000 mL |

**3.1.4 Osnovne otopine**

Otopina tripsina ( 1 mg mL-1)

Osnovna otopina tripsina priređena je dodatkom 50 $μ$L deionizirane vode u 50 $μ$g liofiliziranog tripsina. Konačna koncentracija tripsina je 1 mg mL-1. Radna otopina tripsina priređena je miješanjem 50 $μ$L osnovne otopine tripsina sa 50 $μ$L 25 mM puferom NH4HCO3.

Otopine za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC)

Carrez I otopina

U 100 mL destilirane vode otopljeno je 1,6 g kalij (II) – heksaferocijanita.

Carrez II otopina

U 100 mL destilirane vode otopljeno je 21,9 g cink acetata i 3 g octene kiseline.

Bradford reagens

10 mg boje Comassie brilliant blue G250 otopljeno je u 5 mL 95% etanola i 10 mL 85% fosforne kiseline. Otopina je nadopunjena deioniziranom vodom u odmjernoj tikvici do 100 mL. Nakon što je otopina homogenizirana, profiltrirana je kroz filter papir veličine pore 0,45 nm.

**3.1.5 Pribor, aparature i kemikalije**

Pribor:

* aluminijska folija
* automatske pipete (1000, 200, 20 $μL)$
* pipete od 10 mL
* pipetni nastavci
* propipete
* Erlenmeyerove tikvice različitih volumena
* kivete po Eppendorfu različitih volumena
* laboratorijske žlice
* markeri za pisanje
* Multiwell ploče s jažicama, Falcon
* T-boce, Falcon
* odmjerne tikvice od 10 mL
* papir za vaganje i zamatanje čepova
* plastične Petrijeve zdjelice
* predmetna stakalca
* pokrovna stakalca
* staklene boce
* staklene čaše
* staklene epruvete
* stakleni lijevak
* staklene i plastične menzure različitih volumena
* vata za pravljenje čepova

Aparature:

* analitička vaga model 1712 MP8, Silver edition, Sartorius, Velika Britanija
* aparatura za termostatiranje BTE-S, Termo-medicinski aparati, Hrvatska
* automatska tresilica X-463, New Brunswick scientific, SAD
* Bürker – Türk komorica
* centrifuga za kivete po Eppendorfu HC-240, Tehtnica- Železniki, Slovenija
* hemocitometar
* HPLC kolona MetaCarb 67H, 300 X 6,5 mm
* inkubator s kontroliranom atmosferom CO2 , Forma Scientific, SAD
* komora za sterilni rad (*laminar fow cabinet),* Iskra, Slovenija
* laminar, Iskra HK6, Slovenija
* pH metar
* spektrofotometar Cecil Instruments Ltd, Tehnical Centre Cambridge, Engleska
* svjetlosni mikroskop/invertni svjetlosni mikroskop
* zamrzivač -80°C (*ultra low temperature freezer*), New Brunswick scientific, SAD
* vaga, Sartorius, Velika Britanija
* velika centrifuga J2-21 M/E Centrifuge, Beckman, Velika Britanija
* vibromikser EV-202 i EV-100, Tehtnica-Železniki, Slovenija
* 4800 plus Maldi TOF/TOF, Applied Biosystems, SAD
* Cap LC XE Pump Waters
* Tempo LC Maldi

Kemikalije:

* acetonitril (ACN)
* agar
* amonijev citrat, *Kemika*, Hrvatska
* amonijev dihidrogenfosfat (NH4H2PO4 ), *Kemika*, Hrvatska
* bromtimolno modrilo, *Kemika*, Hrvatska
* Carrez I otopina
* Carrez II otopina
* DMEM medij za uzgoj ljudskih stanica u kulturi
* etanol
* Fetal bovine serum, heat inactivated, Invitrogen, SAD
* kalijev dihidrogenfosfat (KH2PO4), *Kemika*, Hrvatska
* kalijev klorid (KCl), *Kemika*, Hrvatska
* kazein hidrolizat, *Kemika*, Hrvatska
* manganov (II) - sulfat tetrahidrat (MnSO4 x 4 H2O), *Kemika*, Hrvatska
* magnezijev sulfat heptahidrat (MgSO4 x 7 H2O), *Kemika*, Hrvatska
* Man Rogosa Sharpe tekuća podloga (MRS), *Biolife*, Velika Britanija
* Man Rogosa Sharpe kruta podloga (MRS-agar), *Biolife*, Velika Britanija
* mravlja kiselina (0,1%-tna HCOOH)
* natrijev acetat, *Kemika*, Hrvatska
* natrijev citrat, *Kemika*, Hrvatska
* natrijev hidroksid, *Kemika*, Hrvatska
* natrijev klorid (NaCl), *Kemika*, Hrvatska
* natrijev hidrogenfosfat (Na2HPO4), *Kemika,* Hrvatska
* natrijev sulfat (Na2SO4)
* Tripsin/EDTA, Invitrogen, SAD
* Tween 80, *Kemika*, Hrvatska

Programi:

* 4,000 Series Explorer, verzija 3.5.3, *Applied Biosystems*, SAD
* Mass Lynx Spotter MALDI
* Protein Pilot Software 4.5 (*AB SCIEX*)

**3.2 METODE**

**3.2.1 Nasađivanje i uzgoj stanica grkljana**

 Prethodno zamrznuta stanična kultura HEp2 (s 10 % glicerola) otopljena je na 37 °C u vodenoj kupelji. Supernatant koji sadrži ostatke medija i krioprotektivnog sredstva glicerola uklonjen je centrifugiranjem u trajanju od 5 minuta na 100 rpm. Novi medij (1 mL) zagrijan na 37 °C stavljen je na preostali talog. Stanice se resuspendiraju i ponovno centrifugiraju (1000 rpm tijekom 5 minuta) te nasađuju u Petrijevu zdjelicu promjera 5 cm kako bi se potaknula propagacija stanica. Nakon 24 sata inkubacije nasađenih stanica na 37°C, stanice su nasađene u T-bocu većeg volumena i uzgajane do subkonfluetnog stanja, kada se mogu koristiti za eksperiment.

**Priprema stanične suspenzije iz subkonfluentnog monosloja**

Nakon kontrole pod mikroskopom uklonjen je medij sa stanica nasađenih u T-bocu (25 cm2). Medij sadrži tvari koje mogu inhibirati tripsin, stoga su stanice isprane s PBS puferom. Na stanice je dodana minimalna količina 0,025% - tne otopine EDTA - tripsina potrebna da prekrije dno T-boce. Kako bi se utvrdilo kada dolazi do odljepljivanja stanica s dna T-boce potrebna je stalna kontrola pod mikroskopom. Vrijeme izloženosti tripsinu varira, a ovisi o vrsti stanica i o starosti tripsina. Pokazatelji da je došlo do odljepljivanja stanica su promjena oblika stanica iz vretenastog u okrugli oblik i njihovo pokretanje u smjeru kretanja tripsina. Prema Freshney (2000) na stanice se dodaje 5 ili 10 mL medija sa serumom da bi proteolitički učinak tripsina bio zaustavljen. Da bi se mogao izvesti bilo koji eksperiment, stanice je potrebno izbrojati i nasaditi točno određeni broj stanica kako bi se vrijednosti dobivene eksperimentom mogle uspoređivati.

**Određivanje broja stanica pomoću hemocitometra**

Nakon tripsiniziranja, 20 μL uzorka uzeto je iz dobivene stanične suspenzije. Stanice su izbrojane pomoću nanošenja uzorka u Bürker – Türk – ovu komoricu ispod pokrovnog stakalca. Komorica se sastoji od devet velikih kvadrata, a stanice se broje u četiri kvadrata (gornji prvi slijeva i zadnji desni te donji prvi slijeva i zadnji desno) te se iz izbrojenih stanica izračuna srednja vrijednost. Veliki kvadrati se sastoje od šesnaest malih kvadrata. Između pravilno postavljene predmetnice i pokrovnog stakalca uočavaju se Newtonovi kolobari. Prostori između njih iznose 0,1 mm dok su dužina i širina svakog kvadrata 1 mm. Ono rezultira volumenom tekućine iznad svakog velikog kvadrata od 10 -4 mL. Broj stanica se izražava po jednom mililitru stanične suspenzije. Stanice su izbrojane tako da točnost nasađivanja određenog broja stanica bude što veća.

**3.2.2 Uzgoj bakterijskih kultura**

Kulture bakterijskih stanica *L. plantarum* i *S. enterica* zasebno su nacjepljene u MML tekuću hranjivu podlogu te nakon inkubacije u trajanju od 24 sata napravljen je razmaz svake kulture na MRS podlozi. Iz dobivenih kolonija vrškom pipete površinski je zagrebano u razmaz kulture i preneseno u kivete Falcon koje sadrže 5 mL uzgojnog, MRS medija. Inkubacija bakterijskih kultura trajala je 24 sata na tresilici uz miješanje pri 100 okretaja u minuti i pri temperaturi od 37° C. Trajne kulture korištenih sojeva bakterija čuvane su na -70° C uz dodatak 50% - tnog glicerola. Prekonoćne kulture bakterijskih stanica su centrifugirane na 25° C pri 7000 okretaja u minuti. Stanice su resuspendirane u mediju, a gustoća stanica podešena je spektrofotometrijski na način da konačni OD iznosi 0,5 i 0,75.

Uzgojenim stanicama grkljana uklonjen je medij te su stanice dva puta isprane s PBS puferom. U stanice je dodano 0,5 mL suspenzije bakterija (predtretman s *L. plantarum* ili *S. enterica)* određene, prethodno podešene optičke gustoće (0,5 i 0,75) te su stanice inkubirane tijekom 30 i 60 minuta. Supernatant je izdvojen, centrifugiran te spremljen na -20°C. Nakon svakog vremena inkubacije stanice su isprane tri puta sa po 500 μL PBS pufera. Potom je dodano 0,5 mL suspenzije bakterija (posttretman s *L. plantarum* ili *S. enterica*) prethodno podešene gustoće (OD 0,5 i 0,75) te su stanice inkubirane tijekom 30 i 60 minuta. Supernatant je ponovno izdvojen, centrifugiran i pospremljen na -20°C. Nevezane bakterije ponovno su isprane tri puta s PBS puferom. Stanice su tretirane 10 minuta s 0,1%-tnim Tritonom X- 100 koji ne djeluje na rast bakterija. Broj vezanih stanica je određen nacjepljivanjem odgovarajućih decimalnih razrjeđenja na krutu MRS podlogu, nalidiksinsku podlogu (selektivna podloga za *Lactobacillus plantarum*) i citratnu podlogu (selektivna podloga za *Salmonella enterica*). Prvo razrjeđenje je pripremljeno nacjepljivanjem 10 μL orginalne suspenzije u 90 μL PBS pufera. Serija decimalnih razrjeđenja, maksimalno do šestog, pripremana je na opisani način.

Broj stanica u mililitru bakterijske suspenzije izračunat je prema slijedećoj formuli:

broj stanica u mL suspenzije = broj poraslih kolonija/ (volumen upotrebljene suspenzije x decimalno razrjeđenje)

**3.2.3 Djelovanje bakterija na metaboličke produkte stanica grkljana**

Supernatant izdvojen nakon tretmana stanica grkljana (pola ili jedan sat) s odabranom bakterijskom kulturom (3.2.2 poglavlje) je polazni uzorak u kojem se određuju metabolički produkti bakterijskih stanica i stanica raka grkljana. Kao kontrola uzorkovan je supernatant stanica grkljana i bakterijskih stanica uzgojenih odvojeno u istim uvjetima. Potom je po 100 μL uzorka supernatanta prebačeno u odmjernu tikvicu od 10 mL i pomiješano s 5-6 mL destilirane vode. U odmjernu tikvicu dodano je 0,5 mL Carrez I otopine i 0,5 mL Carrez II otopine da bi se istaložili proteini. Uzorci su centrifugirani te im je izmjeren pH. Potom su neutralizirani sa 0,6 mL 0,1M NaOH do pH 8,0 ± 0,5. Volumen je nadopunjen do 10 mL destiliranom vodom. Cijeli sadržaj filtriran je kroz filter papir s porama 0,45 nm. Takav uzorak injektiran je na HPLC kolonu MetaCarb 67H,300 X 6,5 mm. Analize su provedene uz protok mobilne faze 0,7 mL/min i pri temperaturi kolone 60 °C. Na HPLC koloni su prethodno propušteni standardi kako bi se dobio baždarni pravac te pomoću njih izračunale koncentracije određenih spojeva u uzorcima koji se ispituju.

**3.2.4 Djelovanje bakterija na ekspresiju proteina stanica grkljana**

Metoda po Bradfordu se bazira na reakciji proteina s bojom Coomassie brilliant blue G250 u kiselom mediju. Navedena boja reagira s pobočnim grupama bazičnih aminokiselina (argininski i lizinski ostaci) tako da se veže na njih hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama čime je postignuta stabilizacija boje u anionskom obliku. Posljedica tih interakcija je pojava promjene boje iz smeđe u plavu pa se intenzitet obojenja može mjeriti spektrofotometrijski pri 595 nm. Opisanu metodu karakterizira širok opseg proporcionalnosti intenziteta obojenja i koncentracije proteina. Uzorci su najprije prokuhani jednu minutu. Zatim je u svaki uzorak dodano 1 μL tripsina. Uzorci su se koncentrirali centrifugiranjem u trajanju od 35 minuta. Uzorak volumena 1 μL razrijeđen je s 9 μL destilirane vode i dodano je 100 μL Bradford reagensa. Bradford reagens je smjesa etanola, fosfatne kiseline i Coomassie brilliant blue R boje. Koncentracija proteina je očitana na spektrofotometru. Prije mjerenja apsorbancija uzoraka izmjerena je apsorbancija slijepe probe (deionizirana voda + Bradford reagens) te uzeta u obzir prilikom mjerenja apsorbancija pripravljenih otopina proteina. Nakon izmjerene apsorbancije uzorci su ostavljeni na tresilici pri temperaturi od 37°C u trajanju od 12 sati.

**Razdvajanje peptida CapLC sustavom**

CapLC sustav (Waters, SAD) opremljen sa UV/VIS detektorom spojen na TempoTM LC MALDI Spotter (Applied Biosystems, SAD) korišten je za razdvajanje peptida i prikupljanje direktno na MALDI ploču. Kromatografska separacija je izvršena na Symmetry 300TM C18 koloni na silica bazi (300 µm x 150 µm I.D., 3.5 μm veličina čestica, Waters, SAD) pri temperaturi od 40oC. Injektiran je volumen od 4 μL i namješten je protok od 2 μL/min. Temperatura viala održavana je na 5oC. Mobilna faza A sastojala se 98% od 0,1%-tne mravlje kiseline pomiješane s 2%-tnim acetonitrilom (ACN), a mobilna faza B od 98%-tnog ACN-a pomiješanog s 0,1%-tnom mravljom kiselinom. Eluirani peptidi detektirani su u UV apsorpcijskom području pri 280 nm. Propuštanje svakog uzorka trajalo je ukupno 55 minuta. Gradijent je programiran tako da se kroz 35 minuta udio faze B poveća s 5% na 80% i zatim da se kolona kondicionira na početne uvjete do isteka 55 minuta). Uvjeti gradijenta prikazani su u tablici 4. Protok matrice (4,5 mg CHCA otopljeno u 1 mL vodene otopine 50%-tnog ACN-a) namješten je na 2 μL/min.

Tablica 4. Uvjeti gradijenta

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Vrijeme (min) | A(%) | B(%) |
| 0,00 | 95 | 5 |
| 5,00 | 95 | 5 |
| 35,00 | 20 | 80 |
| 45,00 | 95 | 5 |
| 55,00 | 95 | 5 |

**Snimanje uzoraka peptida spektrometrom masa MALDI/TOF-TOF**

Za analizu peptida korišten je spektrometar masa MALDI – TOF/TOF 4800 opremljen sa 200 Hz, 355 nm Nd:YAG laserom. Parametri analize prikazani su u tablici 6. Za postavljanje parametara uređaja korišten je 4000 Series Explorer software verzija 3.5.3. (Applied Biosystems, SAD). Spektri su dobiveni sa prosječno 1800 laserskih udara u području *m/z* 800-4000. Za kalibriranje instrumenta korišteni su signali peptida nastali autolizom tripsina. Nakon snimanja spektara MS upotrebom intrepretacijske metode *engl.* Job wide odabiru se najintenzivniji peptidi prekursori koji se podvrgnu daljnjoj fragmentaciji u instrumentu kako bi se dobio spektar MS/MS. Spektar MS/MS odabranih peptida snimljen je u pozitivnom načinu rada instrumenta uz korištenje zraka kao kolizijske energije.

Tablica 5. Parametri *engl.* Job wide intrepretacijske metode

|  |  |
| --- | --- |
| Minimum S/N filter | 10 |
| Min. Chromatogram Peak Width | 3 |
| Fraction-to-Fraction Precursor Mass Tolerance | 200 ppm |
| Max Precursors | 20 |

Tablica 6. Parametri MALDI –TOF/TOF analize

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Tip analize** | **MS+** | **MS/MS+** |
| Detekcija iona | Pozitivna | Pozitivna |
| Zrcalo | Reflektron | Reflektron |
| Broj snimaka/spektar | 1000 | 2000 |
| Raspon masa/Da | 1000-4000 | 9-3833 |
| Vrijeme odziva/ns | 500 | 400 |

Pretraživanje baze podataka

Baze podataka pretražene su na temelju dobivenih MS i MS/MS spektara korištenjem specijaliziranog računalnog programa Protein Pilot verzija 4.5 (AB SCIEX) s ciljem identifikacije proteina. Pretraživana je NCBInr *Homo sapiens* baza podataka prema zadanim uvjetima pretrage (tablica 7).

 Tablica 7. Parametri za pretraživanje NCBInr *Homo sapiens* baze podataka

|  |
| --- |
| **Pogreška** |
| MS: 100 ppm |
| MS/MS 1 Da |
| **Posttranslacijska modifikacija** |
| Oksidacija metionina |
| **Preskočeno cijepanje tripsina** |
| 1 |

4**Rezultati**

**4.1 Kompeticijsko djelovanje *L. plantarum* i *S.enterica* na humane stanice HEp2**

U cilju utvrđivanja dinamike vezanja stanica *L. plantarum* i *S. enterica* u ovisnosti o njihovom broju za humani epitel stanica karcinoma grkljanaHEp2, stanice epitela izlagane su u vremenima od pola sata i sat, u uvjetima predtretmana *L. plantarum* odnosno *S.enterica*, pri čemu su varirane i optičke gustoće stanica (0.5 i 0.75).

Iz dobivenih vrijednosti izrađen je grafički prikaz ovisnosti logaritamskog broja vezanih stanica po mililitru u ovisnosti o optičkoj gustoći bakterijskih stanica koje su nacijepljene na staničnu liniju HEp2 nakon 30 i 60 minuta tretiranja (slika x). Stanice su pomiješane u odnosu 1:1.

**Slika 4**. Kompeticijsko djelovanje *S. enterica* i *L.plantarum* nakon pola sata predtretmana stanica epitela HEp2 s *L. plantarum*

Na Slici 4 prikazani su rezultati dobiveni nakon tretmana stanica HEp2koje su prvih pola sata tretirane bakterijom *L. plantarum*, a nakon toga pola sata bakterijom *S. enterica*. Iz grafičkog prikaza vidljivo je da dolazi do povećanog rasta patogene bakterije*S.enterica* u odnosu na *L. plantarum*.

**Slika 5**. Kompeticijsko djelovanje *S. enterica* i *L.plantarum* nakon sat vremena predtretmana stanica epitela HEp2 s *L. plantarum*

Na Slici 5 prikazani su rezultati dobiveni nakon tretmana stanica HEp2 koje su prvih sat vremena tretirane bakterijom *L.plantarum*, a nakon toga sat vremena bakterijom *S.enterica*. Iz grafičkog prikaza vidljivo je da dolazi do povećanog rasta patogene bakterije *S.enterica* u odnosu na *L.plantarum*.

**Slika 6**. Kompeticijsko djelovanje *S.enterica* i *L.plantarum* nakon pola sata posttretmana stanica epitela HEp2 s *L.plantarum*.

Na Slici 6 prikazani su rezultati dobiveni nakon tretmana stanica HEp2 koje su prvih pola sata tretirane bakterijom *S.enetrica*, a nakon toga pola sata bakterijom *L.plantarum*. Iz grafičkog prikaza vidljievo je da dolazi do povećanog rasta bakterije *L.plantarum* u odnosu na patogenu bakteriju *S.enterica*.

**Slika 7**. Kompeticijsko djelovanje *S.enterica* i *L.plantarum* nakon sat vremena posttretmana stanica epitela HEp2 s *L.plantarum*.

Na slici 7. prikazani su rezultati dobiveni nakon tretmana stanica HEp2 koje su prvih sat vremena tretirane bakterijom *S.enterica*, a nakon toga sat vremena bakterijom *L.plantarum*. Iz grafičkog prikaza vidljivo je da dolazi do povećanog rasta patogene bakterije *S.enterica* u odnosu na bakteriju *L.plantarum*.

**4.2 Djelovanje stanica *L. plantarum* i *S. enterica* na metaboličke produkte humanih stanica HEp2**

Nakon tretmana humanih stanica epitela s različitim optičkim gustoćama *S. enterica* i *L. plantarum* u različitim vremenima i uvjetima predtretmana, uzorkovan je medij u kojem su humane stanice tretirane s bakterijama kako bi se odredili metabolički produkti koji nastaju prilikom tih interakcija.

Za određivanje metaboličkih produkata korištena je HPLC metoda. Izmjerene količine metaboličkih produkata koje su određene nakon tretmana stanica epitela s bakterijskim kulturama, uspoređene su s količinama metabolita izlučenih u medij nakon uzgoja epitelnih stanica bez prisustva bakterija, te s količinama metabolita izlučenih u medij nakon uzgoja samih bakterijskih kultura.

Iz prethodno određenih baždarnih dijagrama za mliječnu, octenu i propionsku kiselinu izračunate su masene koncentarcije mliječne, octene i propionske kiseline prisutne u uzorcima. Rezultati su grafički prikazani kao ovisnost masene koncentracije o optičkoj gustoći bakterijskih stanica. Baždarni dijagrami za mliječnu, octenu i propionsku kiselinu prikazani su u poglavlju Prilozi.

Na Slici 8 prikazana je razlika između masenih koncentracija mliječne kiseline nastalih nakon tretmana epitelnih stanica s bakterijama različite optičke gustoće u različitim vremenima tretmana te su te vrijednosti uspoređene s koncentracijom mliječne kiseline koju priozvode epitelne stanice.

**Slika 8**. Koncentracija mliječne kiseline

Na Slici 8 vidljivo je da nema većih razlika između masenih koncentracija mliječne kiseline u HEp2 stanicama tretiranim bakterijama i u kontrolnim HEp2 stanicama.

Na Slici 9. prikazane su izmjerene vrijednosti masenih koncentracija nastale octene kiseline.

**Slika 9.**Koncentracija octene kiseline

Na Slici 9. može se primjetiti da dolazi do značajnih razlike u koncentracijama octene kiseline u ovisnosti o uvjetima tretmana humanih stanica s bakterijskim kulturama. Humane stanice HEp2 ne proizvode značajne količine octene kiseline. Stanice tretirane kombinacijom bakterija različitih optičkih gustoća proizvele su više octene kiseline u odnosu na kontrolne HEp2 stanice.

Na Slici 10 prikazane su masene koncentracije nastale propionske kiseline.

**Slika 10. .**Koncentracija propionske kiseline

Iz Slike 10 je vidljivo da je koncentracija propionske kiseline veća u kontrolnih HEp2 stanica nego kada su tretirane zasebno bakterijama ili njihovom kombinacijom.

**4.3 Djelovanje bakterija *L.plantarum* i *S.enterica* na ekspresiju proteina HEp2 stanica**

U Tablicama 8., 9 i 10. nalaze se rezltati dobiveni određivanjem proteina u lizatima HEp2 stanične linije nakon polasatnog izlaganja stanica bakterijskoj kulturi *S.enterica* O.D. 0,75, te naknadnog izlaganja kulturi *L. plantarum*, O.D. 0,5. Sastav proteina uspoređen je sa sastavom proteina eksprimiranih u stanicama izloženih djelovanju *S. enterica* i *L. plantarum*, te sa proteinima normalno eksprimiranim u HEp2 stanicama. Proteini su određeni spektrometrijom masa.

**Tablica 8.** Lista proteina koje HEp2 stanice razlikovno eksprimiraju nakon vezanja bakterije *S.enterica* u koncentraciji 0,75 OD nakon 30 minuta

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **izvor** | **pristupni broj\*** | **ime proteina (engl.)** | **funkcija \*\*** |
| HEp2 | [gi|189054552](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit2) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|74739412](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit4) | Putative beta-actin-like protein 3 | izgradnja mirofibrila |
| [gi|62420916](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit6) | actin-like protein | izgradnja miofibrila |
| [gi|181486](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit7) | DNA-binding protein B, partial | procesiranje mRNA |
| [gi|32015](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit9) | alpha-tubulin | građa mikrotubula |
| [gi|194378142](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit10) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|62420949](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit11) | actin-like protein | izgradnja miofibrila |
| [gi|31645](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit12) | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | metabolizam ugljikohidrata |
| [gi|63055057](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit13) | beta-actin-like protein 2 | izgradnja miofibrila |
| [gi|178027](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit14) | alpha-actin | izgradnja miofibrila |
| [gi|21739834](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit15) | hypothetical protein | funkcija nepoznata |
| [gi|5174735](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit16) | tubulin beta-4B chain | građa mikrotubula |
| [gi|223429](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit17) | tubulin beta | građa mikrotubula |
| [gi|30582781](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit18) | tubulin, beta, 4 | građa mikrotubula |
| [gi|27754056](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit19) | tubulin beta-6 chain [Mus musculus] | građa mikrotubula |
| [gi|119610379](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit20) | mitogen-activated protein kinase kinase 4, isoform CRA\_a | stanično signaliziranje |
| [gi|75707349](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit21) | immunoglobulin heavy chain variable region | imunološki odgovor |
| [gi|302375764](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit22) | NADH dehydrogenase subunit 5 | metabolizam NADH |
| [gi|30582117](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit23) | folylpolyglutamate synthase | mitohondrijski enzim |
| [gi|2209015](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit24) | lysosomal alpha-mannosidase | degradacija glikana |
| [gi|21740279](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit25) | hypothetical protein | funkcija nepoznata |
| [gi|3170458](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit26) | diphthamide biosynthesis protein-2 | sinteza diftamida |
| [gi|1103931](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit27) | T-cell receptor alpha chain, partial | receptor |
| [gi|114147552](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit28) | immunoglobulin heavy chain variable region | imunološki odgovor |
| [gi|114147574](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit29) | immunoglobulin heavy chain variable region | imunološki odgovor |
| [gi|118405951](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit30) | immunoglobulin heavy chain variable region | imunološki odgovor |
| [gi|119608634](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit31) | serologically defined colon cancer antigen 3, isoform CRA\_a | imunološki odgovor |
| [gi|4204880](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit32) | heat shock protein | obrana od stresnog stanja |
| [gi|4506091](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit33) | mitogen-activated protein kinase 6 | stanično signaliziranje |
| [gi|89886217](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit34) | cerebellin-3 precursor | sklapanje atipičnih komplekasa kolagena |
| [gi|313507136](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit35) | Hemoglobin Thionville | transport kisika |
| [gi|519674596](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit36) | immunoglobulin A heavy chain variable region, partial | imunološki odgovor |
| [gi|34364635](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit37) | hypothetical protein | funkcija nepoznata |
| [gi|7662068](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit38) | protocadherin alpha-9 isoform 2 precursor | međustanična adhezija |
| [gi|326205285](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit39) | tetraspanin-10 | stanično signaliziranje |
| [gi|1620884](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit40) | p52 isoform of N-Shc | regulacija proliferacije,angiogeneze i invazije |
| [gi|4589590](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit41) | KIAA0973 protein | Microtubula-vezajuća serin/threonin kinazna funkcija |
| [gi|296277](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit42) | MHC class II antigen | imunološki odgovor |
| [gi|194388488](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit44) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|4567068](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit45) | tumor suppressing STF cDNA 4 | tumor supresor |
| HEp2 + *Salmonella enterica* | [gi|35053](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit2) | uracil DNA glycosylase | HIF-1 signalni put |
| [gi|6650826](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit4) | PRO2044 | Transport |
| [gi|4501881](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit6) | actin, alpha skeletal muscle | izgradnja miofibrila |
| [gi|178067](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit7) | actin prepeptide, partial | izgradnja miofibrila |
| [gi|386758](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit8) | GRP78 precursor, partial | Stanična proliferacija, diferencijacija i migracija |
| [gi|10436240](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit9) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|229751](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit11) | Haemoglobin | transport kisika |
| [gi|306890](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit12) | chaperonin (HSP60) | smatanje proteina i obrana od stresnog stanja |
| [gi|825671](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit13) | B23 nucleophosmin (280 AA) | dekondenzacija proteina |
| [gi|5031857](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit14) | L-lactate dehydrogenase A chain isoform 1 | metabolizam ugljikohidrata |
| [gi|136066](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit16) | Triosephosphate isomerase | metabolizam ugljikohidrata |
| [gi|62897413](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit17) | pyruvate kinase 3 isoform 1 variant | metabolizam ugljikohidrata |
| [gi|33286420](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit18) | pyruvate kinase PKM isoform b | metabolizam ugljikohidrata |
| [gi|32111](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit19) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|119623487](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit20) | histone 1, H2bj, isoform CRA\_b | izgradnja nukleosoma |
| [gi|148733168](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit21) | ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 4 | transkripcija |
| [gi|119595183](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit22) | SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2, isoform CRA\_g | metabolizam glutamata |
| [gi|184427](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit23) | heparan sulfate proteoglycan | metabolizam kolesterola |
| [gi|390980999](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit24) | Sigma In Complex With Padi6 | stanična proliferacija i apoptoza |
| [gi|119578813](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit25) | hCG2011101 | stanična proliferacija,apoptoza |
| [gi|365927536](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit26) | YWHAE/FAM22A fusion protein, partial | regulacija staničnog ciklusa |
| [gi|3387922](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit27) | 14.3.3 protein | Hippo signalni put |
| [gi|112180338](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit28) | UBE2G1 protein, partial | degradacija oštečenih proteina |
| [gi|121281201](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit29) | immunoglobulin heavy chain variable region | imunološki odgovor |
| [gi|602278](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit30) | VAT1 protein | metabolizam NADH |
| [gi|6102947](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit31) | hypothetical protein | funkcija nepoznata |
| [gi|5729877](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit32) | heat shock cognate 71 kDa protein isoform 1 | obrana od stresnog stanja |
| [gi|306891](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit34) | 90kDa heat shock protein | obrana od stresnog stanja |
| [gi|119602173](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit35) | heat shock protein 90kDa | obrana od stresnog stanja |
| [gi|37267](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit36) | transketolase | put pentoza fosfata |
| [gi|119583049](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit38) | hCG1649526, isoform CRA\_a | nepoznata funkcija |
| [gi|558216](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit39) | ketohexokinase | metabolizam ugljikohidrata |
| [gi|21752857](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit40) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|290245126](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit41) | ATP synthase subunit 6 | sinteza ATP-a |
| [gi|8489817](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit42) | SWI-SNF complex protein p270 | modifikacija kromatina |
| [gi|119609317](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004328.dat#Hit43) | hCG2045495 | nepoznata funkcija |

\* pristupni broj u bazi podataka NCBInr

\*\* prema bazi podataka NCBI nr

**Tablica 9.** Lista proteina koje HEp2 stanice razlikovno eksprimiraju nakon vezanja bakterije *L.plantarum* u koncentraciji 0,5 OD nakon 30 minuta

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **izvor** | **pristupni broj\*** | **ime proteina (engl.)** | **funkcija \*\*** |
| HEp2 | [gi|189054552](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit2) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|74739412](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit4) | Putative beta-actin-like protein 3 | izgradnja mirofibrila |
| [gi|62420916](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit6) | actin-like protein | izgradnja miofibrila |
| [gi|181486](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit7) | DNA-binding protein B, partial | procesiranje mRNA |
| [gi|32015](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit9) | alpha-tubulin | građa mikrotubula |
| [gi|194378142](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit10) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|62420949](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit11) | actin-like protein | izgradnja miofibrila |
| [gi|31645](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit12) | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | metabolizam ugljikohidrata |
| [gi|63055057](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit13) | beta-actin-like protein 2 | izgradnja miofibrila |
| [gi|178027](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit14) | alpha-actin | izgradnja miofibrila |
| [gi|21739834](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit15) | hypothetical protein | funkcija nepoznata |
| [gi|5174735](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit16) | tubulin beta-4B chain | građa mikrotubula |
| [gi|223429](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit17) | tubulin beta | građa mikrotubula |
| [gi|30582781](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit18) | tubulin, beta, 4 | građa mikrotubula |
| [gi|27754056](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit19) | tubulin beta-6 chain [Musmusculus] | građa mikrotubula |
| [gi|119610379](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit20) | mitogen-activated protein kinase kinase 4, isoform CRA\_a | stanično signaliziranje |
| [gi|75707349](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit21) | immunoglobulin heavy chain variable region | imunološki odgovor |
| [gi|302375764](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit22) | NADH dehydrogenase subunit 5 | metabolizam NADH |
| [gi|30582117](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit23) | folylpolyglutamate synthase | mitohondrijski enzim |
| [gi|2209015](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit24) | lysosomal alpha-mannosidase | degradacija glikana |
| [gi|21740279](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit25) | hypothetical protein | funkcija nepoznata |
| [gi|3170458](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit26) | diphthamide biosynthesis protein-2 | sinteza diftamida |
| [gi|1103931](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit27) | T-cell receptor alpha chain, partial | receptor |
| [gi|114147552](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit28) | immunoglobulin heavy chain variable region | imunološki odgovor |
| [gi|114147574](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit29) | immunoglobulin heavy chain variable region | imunološki odgovor |
| [gi|118405951](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit30) | immunoglobulin heavy chain variable region | imunološki odgovor |
| [gi|119608634](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit31) | serologically defined colon cancer antigen 3, isoform CRA\_a | imunološki odgovor |
| [gi|4204880](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit32) | heat shock protein | obrana od stresnog stanja |
| [gi|4506091](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit33) | mitogen-activated protein kinase 6 | stanično signaliziranje |
| [gi|89886217](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit34) | cerebellin-3 precursor | sklapanje atipičnih komplekasa kolagena |
| [gi|313507136](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit35) | Hemoglobin Thionville | transport kisika |
| [gi|519674596](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit36) | immunoglobulin A heavy chain variable region, partial | imunološki odgovor |
| [gi|34364635](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit37) | hypothetical protein | funkcija nepoznata |
| [gi|7662068](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit38) | protocadherin alpha-9 isoform 2 precursor | međustanična adhezija |
| [gi|326205285](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit39) | tetraspanin-10 | stanično signaliziranje |
| [gi|1620884](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit40) | p52 isoform of N-Shc | regulacija proliferacije,angiogeneze i invazije |
| [gi|4589590](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit41) | KIAA0973 protein | Microtubula-vezajuća serin/threonin kinazna funkcija |
| [gi|296277](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit42) | MHC class II antigen | imunološki odgovor |
| [gi|194388488](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit44) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|4567068](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit45) | tumor suppressing STF cDNA 4 | tumor supresor |
| [gi|296277](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit42) | MHC class II antigen | imunološki odgovor |
| [gi|194388488](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit44) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|4567068](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit45) | tumor suppressing STF cDNA 4 | tumor supresor |
| [gi|459352730](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit3) | POTE ankyrin domain family member J [Homo sapiens] | biološka funkcija nepoznata, moguća uloga u apoptozi (Liu XF i sur., 2009) |
| [gi|35053](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit4) | uracil DNA glycosylase | HIF-1 signalni put |
| [gi|332164775](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit6) | pyruvate kinase PKM isoform c | metabolizam ugljikohidrata |
| [gi|5729877](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit7) | heat shock cognate 71 kDa protein isoform 1 | obrana od stresnog stanja |
| [gi|2981743](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit8) | Secypa | smatanje proteina |
| [gi|4505763](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit9) | phosphoglycerate kinase 1 | metabolizam ugljikohidrata |
| [gi|160707881](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit10) | formin-2 | organizacija citoskeleta |
| [gi|340021](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit11) | alpha-tubulin | građa mikrotubula |
| [gi|119626083](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit12) | albumin, isoform CRA\_t | transport |
| [gi|320042490](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit13) | immunoglobulin heavy chain variable region | imunološki odgovor |
| [gi|4757900](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit14) | calreticulin precursor | regulacija kalcija |
| [gi|530389412](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit15) | regulating synaptic membrane exocytosis protein 2 isoform X1 | funkcija nepoznata |
| [gi|20070163](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit16) | voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1G isoform1 | Kalcij signalni put |
| [gi|194719561](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit17) | immunoglobulin heavy chain variable region | imunološki odgovor |
| [gi|283807084](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit18) | Acc2 | metabolizam lipida |
| [gi|2138330](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit19) | acetyl-CoA carboxylase | sinteza dugolančanih masnih kiselina |
| [gi|9453884](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit20) | 16-5-5 | Hippo signalni put |
| [gi|119624732](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit21) | hCG1647289 | nepoznata funkcija |
| [gi|4507949](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit22) | 14-3-3 protein beta/alpha | Hippo signalni put |
| [gi|186972958](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit24) | Phosphodiesterase 10a | cGMP signalni put |
| [gi|17149816](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit25) | Na,K-ATPase alpha-4 subunit | cAMP signalni put |
| [gi|21752363](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit26) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|530414043](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit27) | PREDICTED: endothelial lipase isoform X1 | metabolizam lipida |
| [gi|330375813](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit28) | multidrug resistance protein 1 | transporter |
| [gi|190613719](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit29) | Hsp70 | obrana od stresnog stanja |
| [gi|188492](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit30) | heat shock-induced protein | obrana od stresnog stanja |
| [gi|189053342](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit31) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|61970197](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit32) | anti-oxLDL immunoglobulin heavy chain variable region, partia | imunološki odgovor |
| [gi|28549](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit33) | alpha globin | transport kisika ? |
| [gi|3599521](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit34) | musculin | Id signalni put |
| [gi|73917683](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit35) | Putative cytochrome P450 | oksidativna fosforilacija |
| [gi|385998](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit36) | Notch neurogenic protein homolog | interakcije ANK |
| [gi|11968023](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit37) | zinc finger protein 106 isoform 1 | mRNA procesiranje |
| [gi|29826282](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit38) | protein phosphatase 1G | mRNA procesiranje |
| [gi|13374351](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150428/F004330.dat#Hit39) | apolipoprotein L4 | kolesteroltransport |

\* pristupni broj u bazi podataka NCBInr

\*\* prema bazi podataka NCBI nr

**Tablica 10.** Lista proteina koje HEp2 stanice razlikovno eksprimiraju nakon vezanja kombinacije bakterija *S.eneterica* OD 0.75 i *L.plantarum* O.D 0,5 nakon 30 minuta tretmana

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **izvor** | **pristupni broj\*** | **ime proteina (engl.)** | **funkcija \*\*** |
| HEp2  | [gi|189054552](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit2) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|74739412](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit4) | Putative beta-actin-like protein 3 | izgradnja mirofibrila |
| [gi|62420916](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit6) | actin-like protein | izgradnja miofibrila |
| [gi|181486](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit7) | DNA-binding protein B, partial | procesiranje mRNA |
| [gi|32015](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit9) | alpha-tubulin | građa mikrotubula |
| [gi|194378142](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit10) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|62420949](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit11) | actin-like protein | izgradnja miofibrila |
| [gi|31645](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit12) | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | metabolizam ugljikohidrata |
| [gi|63055057](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit13) | beta-actin-like protein 2 | izgradnja miofibrila |
| [gi|178027](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit14) | alpha-actin | izgradnja miofibrila |
| [gi|21739834](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit15) | hypothetical protein | funkcija nepoznata |
| [gi|5174735](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit16) | tubulin beta-4B chain | građa mikrotubula |
| [gi|223429](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit17) | tubulin beta | građa mikrotubula |
| [gi|30582781](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit18) | tubulin, beta, 4 | građa mikrotubula |
| [gi|27754056](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit19) | tubulin beta-6 chain [Mus musculus] | građa mikrotubula |
| [gi|119610379](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit20) | mitogen-activated protein kinase kinase 4, isoform CRA\_a | stanično signaliziranje |
| [gi|75707349](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit21) | immunoglobulin heavy chain variable region | imunološki odgovor |
| [gi|302375764](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit22) | NADH dehydrogenase subunit 5 | metabolizam NADH |
| [gi|30582117](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit23) | folylpolyglutamate synthase | mitohondrijski enzim |
| [gi|2209015](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit24) | lysosomal alpha-mannosidase | degradacija glikana |
| [gi|21740279](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit25) | hypothetical protein | funkcija nepoznata |
| [gi|3170458](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit26) | diphthamide biosynthesis protein-2 | sinteza diftamida |
| [gi|1103931](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit27) | T-cell receptor alpha chain, partial | receptor |
| [gi|114147552](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit28) | immunoglobulin heavy chain variable region | imunološki odgovor |
| [gi|114147574](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit29) | immunoglobulin heavy chain variable region | imunološki odgovor |
| [gi|118405951](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit30) | immunoglobulin heavy chain variable region | imunološki odgovor |
| [gi|119608634](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit31) | serologically defined colon cancer antigen 3, isoform CRA\_a | imunološki odgovor |
| [gi|4204880](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit32) | heat shock protein | obrana od stresnog stanja |
| [gi|4506091](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit33) | mitogen-activated protein kinase 6 | stanično signaliziranje |
| [gi|89886217](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit34) | cerebellin-3 precursor | sklapanje atipičnih komplekasa kolagena |
| [gi|313507136](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit35) | Hemoglobin Thionville | transport kisika |
| [gi|519674596](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit36) | immunoglobulin A heavy chain variable region | imunološki odgovor |
| [gi|34364635](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit37) | hypothetical protein | funkcija nepoznata |
| [gi|7662068](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit38) | protocadherin alpha-9 isoform 2 precursor | međustanična adhezija |
| [gi|326205285](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit39) | tetraspanin-10 | stanično signaliziranje |
| [gi|1620884](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit40) | p52 isoform of N-Shc | regulacija proliferacije,angiogeneze i invazije |
| [gi|4589590](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit41) | KIAA0973 protein | Microtubula-vezajuća serin/threonin kinazna funkcija |
| [gi|296277](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit42) | MHC class II antigen | imunološki odgovor |
| [gi|194388488](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit44) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|4567068](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150426/F004325.dat#Hit45) | tumor suppressing STF cDNA 4 | tumor supresor |
| HEp2 + *Salmonella enterica* + *Lactobacillum plantarum* | [gi|4501887](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit1) | actin, cytoplasmic 2 | izgradnja miofibrila |
| [gi|134133226](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit2) | POTE ankyrin domain family member E | biološka funkcija nepoznata, moguća uloga u apoptozi (Liu XF i sur., 2009) |
| [gi|306891](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit4) | 90kDa heat shock protein | obrana od stresnog stanja |
| [gi|194386708](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit5) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|28173554](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit6) | histone H2B type 3-B | izgradnja nukleosoma |
| [gi|14389309](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit8) | tubulin alpha-1C chain | građa mikrotubula |
| [gi|194385120](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit9) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|136066](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit10) | Triosephosphate isomerase | metabolizam ugljikohidrata |
| [gi|36102](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit11) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|194382016](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit12) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|763431](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit14) | albumin-like | transport |
| [gi|32111](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit15) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|4507949](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit16) | 14-3-3 protein beta/alpha | Hippo signalni put |
| [gi|62702217](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit17) | unknown | funkcija nepoznata |
| [gi|30354619](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit18) | YWHAZ protein, partial | Hippo signalni put |
| [gi|386758](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit20) | GRP78 precursor, partial | MAPK signalni put |
| [gi|229751](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit21) | Haemoglobin | transport kisika |
| [gi|338695](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit22) | beta-tubulin | građa mikrotubula |
| [gi|119609402](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit23) | guanine nucleotide binding protein (G protein) | cGMP-PKG signalni put |
| [gi|31092](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit25) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|259090349](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit26) | 70kda Heat Shock Protein 5 | obrana od stresnog stanja |
| [gi|4507877](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit27) | vinculin isoform VCL | stanična adhezija |
| [gi|119600169](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit28) | hCG2040339 | metabolizam NADH |
| [gi|2661039](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit29) | alpha enolase | metabolizam ugljikohidrata |
| [gi|21749569](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit30) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|2981743](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit31) | Secypa | smatanje proteina |
| [gi|1041969](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit32) | 17 kda cyclophilin A | smatanje proteina |
| [gi|270346692](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit33) | Cypa | smatanje proteina |
| [gi|578795329](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit34) | uncharacterized protein | funkcija nepoznata |
| [gi|148733168](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit35) | tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 4 | smatanje proteina, transkripcija, stanični ciklus |
| [gi|10436240](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit37) | unnamed protein product | funkcija nepoznata |
| [gi|6165845](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit38) | tenascin-M1 | međustabično signaliziranje |
| [gi|62088540](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit39) | aconitase 1 variant | citratni ciklus |
| [gi|1469914](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit40) | P2 purinergic receptor | receptor |
| [gi|119608334](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit42) | hCG2023911 | nepoznata funkcija |
| [gi|5478318](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit43) | SET-binding protein (SEB) | DNA replikacija |
| [gi|578838161](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit44) | uncharacterized protein LOC102724413 | nepoznata funkcija |
| [gi|496330](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit46) | IKBL | interakcije ANK |
| [gi|82802829](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit47) | rcNSEP1 | obrana od stresnog stanja |
| [gi|51094716](http://pilot/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20150427/F004329.dat#Hit49) | KIAA0415 gene product | transkripcijski faktor |

\* pristupni broj u bazi podataka NCBInr\*\* prema bazi podataka NCBI nr

U Tablicama 8., 9. i 10. vidi se da nakon vezanja bakterijskih stanica na HEp 2 stanice dolazi do smanjenja ekspresije proteina odgovornih za imunološki odgovor. Isti efekt uočen je u slučaju kada su stanice HEp2 tretirane samo bakterijom *L.plantarum*, odnosno samo bakterijom *S.enterica*. Također je uočena promjena u građi staničnog skeleta, odnosno, došlo je do smanjenja ekspresije proteina uključenih u izgradnju mikrofibrila i mikrotubula. Jednake su razlike uočene i kada su stanice HEp2 tretirane sa svakom bakterijom zasebno. Kao i u prethodna dva slučaja, kada su na stanice HEp2 vezane bakterije *S.eneterica*, odnosno *L.plantarum*, povećana je ekspresija proteina čija je uloga u obrani stanice od stresa. U slučaju kada je na stanice HEp2 vezana kombinacija bakterija *S.enterica* i *L.plantarum* uočava se povećanje ekspresije proteina koji su uključeni u smatanje proteina.

5**Rasprava**

**Kompeticijsko djelovanje *L. plantarum* i *S. enterica***

Enterobakterije su skupina gram negativnih bakterija i uzročnici su mnogih infektivnih bolesti kod ljudi kao na primjer infekcija probavnog sustava i infekcija mokraćnog sustava. Velika prilagodljivost i kratko generacijsko vrijeme bakterija njihova su evolucijska prednost. Najveći problem predstavlja mogućnost urođene i stečene bakterijske otpornosti na antibiotike (Andrašević i sur.,2009). Adhezija enterobakterija za epitelni sloj probavnog trakta čovjeka je ključni korak koji doprinosi njihovoj virulenciji i infektivnom djelovanju (Dhanani i Bagchi, 2013). S druge strane, bakterije mliječne kiseline povoljno djeluju na ljudsko zdravlje. Stupaju u interakciju sa stanicama epitela probavnog sustava te značajno utječu na funkciju probavnog sustava čovjeka, a neki sojevi proizvode bakteriocine odnosno spojeve s antimikrobnom aktivnošću (Halasz, 2009). Zahvaljujući brojnim aktivnim tvarima koje proizvode pokazuju antagonističko djelovanje na neke patogene vrste u probavnom sustavu čovjeka (Kršev, 1996).

Sposobnost adhezije je bitan preduvjet za kolonizaciju probiotičkih sojeva u gastrointestinalnom traktu. U *in vivo* uvjetima, površine epitelnih stanica su gusto prekrivene autohtonom mikroflorom, koje su fizička barijera nadolazećim bakterijam da adheziraju površinu epitelnih stanica. Kolonizacija poželjnih probiotičkih sojeva spriječava kolonizaciju štetnih patogenih bakterija, te smanjuje njihov broj (Frece i sur., 2001).

Kompeticijsko djelovanje bakterija mliječne kiseline *L. plantarum* i enterobakterije *S. enterica* proučavano u ovom radu pokazuje da enterobakterije imaju značajno veću sposobnost adhezije za epitel stanica HEp2 od bakterije *L. plantarum* u omjerima miješanja 1:1.

Prema rezultatima dobivenim nakon tretmana stanica HEp2 koje su prvih pola sata tretirane bakterijom *L. plantarum*, a nakon toga pola sata enterobakterijom *S. enterica*, vidljivo je da dolazi do povećanog rasta patogene bakterije *S.enterica* u odnosu na *L. plantarum* neovisno o početnim optičkim gustoćama bakterija. Nakon sat vremena nema značajnijih razlika u odnosu na tretman od pola sata, *S. enterica* prerasta *L. plantarum.* Također, kada su stanice HEp2 prvih sat vremena tretirane bakterijom *S. enterica*, a nakon toga sat vremena bakterijom *L. plantarum*, ponovno *S. enterica* prerasta *L. plantarum.*

Drugačiji rezultati dobiveni su eksperimentom u kojemu su stanice HEp2 prvih pola sata tretirane bakterijom *S. enterica*, a nakon toga pola sata bakterijom *L. plantarum*. Zabilježen je veći rast *L. plantarum* u odnosu na *S. enterica* neovisno o početnim gustoćama.

**Djelovanje bakterija *L. plantarum* i *S. enterica* na metaboličke produkte stanica grkljana**

Poznato je da bakterije mliječne kiseline proizvode antimikrobne tvari, uključujući i metabolite kao što su organske kiseline. Proizvodnjom antimikrobnih tvari bakterije mliječne kiseline ometaju razmnožavanje nepoželjnih crijevnih mikroorganizama, a s druge strane onemogućavaju vezanje patogenih mikroorganizama za crijevni epitel u većem broju (Kršev i Borović, 1994).

Djelovanje bakterija *L. plantarum* i *S. enterica* na metaboličke produkte humanih stanica karcinoma grkljana detektirano je visoko djelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC). HPLC je analitička metoda koja omogućuje kvalitativne (da li je određeni spoj prisutan u uzorku) i kvantitativne (kolika je koncentracija određenog spoja u uzorku) analize (Oona McPolin, 2009). HPLC je kromatografska metoda koja radi na principu odjeljivanja sastojaka smjese na temelju različitog vremena zadržavanja određenog spoja nošenog mobilnom fazom u stacionarnoj fazi. Iz baždarnog dijagrama za određeni spoj moguće je izračunati masene koncentracije željenog spoja ukoliko je on prisutan u uzorku. U uzorcima su detektirane sljedeće organske kiseline: mliječna, octena i propionska, stoga smo za izračunavanje koncentracija koristili njihove baždarne dijagrame.

Kako bi se mogao donijeti pravilan zaključak o prisutnosti i koncentraciji spomenutih kiselina u uzorcima, ispitivani su uzorci medija nakon uzgoja stanica HEp2 koje nisu tretirane s bakterijama, stanica HEp2 koje su tretirane s bakterijama, bakterijskih stanica te sterilan medij korišten u eksperimentu. Ispitivanja su provedena pri optičkoj gustoći stanica *L. plantarum* 0,5 i 0,75, te *S. enterica* 0,5 i 0,75. Rezultati pokazuju da nema većih razlika između masenih koncentracija mliječne kiseline u HEp2 stanicama tretiranim bakterijama i u kontrolnim HEp2 stanicama. U uzorcima u kojima su HEp2 stanice tretirane bakterijom *L. plantarum* zabilježena je najmanja koncentracija mliječne kiseline.Također stanice HEp2 tretirane bakterijama proizvode manje mliječne kiseline kao metaboličkog produkta stanica nego HEp2 stanice kada se uzgajaju zasebno. Dobiveni rezultati mogu se objasniti kroz kompeticiju stanica HEp2 i bakterija *L. plantarum* za izvor energije tj. izvor ugljika. Drugi mogući uzrok smanjene proizvodnje mliječne kiseline je mijenjanje metabolizma stanica HEp2 kojemu je glavni način dobivanja energije ciklus mliječne kiseline. *L. plantarum* usporava navedeni metabolizam.

Nadalje, iz rezultata vidljive su značajnije razlike u koncentracijama octene kiseline. Humane stanice HEp2, ne proizvode značajne količine octene kiseline. Stanice tretirane kombinacijom bakterija različitih optičkih gustoća proizvele su više octene kiseline u odnosu na kontrolne HEp2 stanice. Do statistički značajne pojačane produkcije octene kiseline došlo je u uzorcima u kojima su HEp2 stanice prvo tretirane bakterijom *S.enterica* optičke gustoće 0,5 i 0,75, a zatim bakterijom *L. plantarum* optičke gustoće 0,5 i 0,75. Octena kiselina koje proizvode određeni sojevi bakterije mliječne kiseline izazvala je inhibiciju mutagena u *in vitro* staničnim kulturama. Uočeno je da su sojevi bakterija mliječne kiseline imali reducirajući učinak na koncentraciju okratoksin - mikotoksina sa kancerogenim, imunosupresivnim i genotoksičnim učinkom na ljudske stanice (Ljungh i Wadström, 2006).

Koncentracija propionske kiseline veća je u kontrolnih HEp2 stanica nego kada su tretirane zasebno bakterijama ili njihovom kombinacijom.

**Odgovor Hep2 stanica na vezanje *Salmonella enterica***

Nakon tretiranja stanica HEp2 s patogenom bakterijom *S.enterica*, optičke gustoće 0,75 u tretmanu trajanja od 30 minuta ispitan je odgovor HEp2 stanica na vezanje bakterija *S. enterica* proteosmkim pristupom. Razlikovnom analizom proteina uočeno je da je u stanicama na koje su vezane bakterije *S.enterica* došlo do povećane ekspresije proteina čija je biološka funkcija obrana stanice od stresnog stanja (Heat Shock Protein 71kDa, Heat Shock Protein 90kDA i Chaperonin). Također, uočena je promjena u građi staničnog citoskeleta, smanjena je izgradnja mikrofibrila (Actin alpha, Actin prepeptid, actin-like protein, putative beta-actin like protein) te mikrotubula (Tubulin beta). Nakon vezanja stanica *S.enterica* dolazi i do smanjene ekspresije proteina odgovornih za imunološki odgovor (Imunoglobulini). Vezanjem bakterijskih stanica *S.enterica* na stanice HEp2 došlo je do povećane ekspresije proteina uključenih u metabolizam ugljikohidrata (L-laktat dehidrogenaza, Triozafosfat izomeraza, Piruvat kinaza, Ketoheksokinaza). Razlikovnom analizom uočeno je da je u stanicama na koje su vezane bakterije došlo do promjene u ekspresiji 77 proteina.

*S.enterica* je invazivan, fakultativni unutarstanični patogen u ljudi i životinja, koji ima sposobnost kolonizacije različtih niša u različitim domaćinima. Patogeneza infekcije zahtjeva prijanjanje na različitim površinama stanica domaćina, a može se naći velik broj struktura koje služe kao „ljepilo“. Ovisno o serotipu, identificirano je više od deset različitih fimbrijalnih adhezina, kao na primjer, tip I, Fim, Lpf (long polar fimbriae), Tafi (thin aggregative fimbriae (Wegner i Hensel, 2011). Adhezija na epitelne stanice sisavaca ključni je proces za preživljavanje i kolonizaciju bakterija. Za patogene bakterije, adhezija na epitel je ključan korak, budući da omogućava otpuštanje enzima i toksina čime se pokreću nekrotični procesi izravno u ciljane stanice, što olakšava invaziju (Jankowska i sur., 2008).

**Odgovor Hep2 stanica na vezanje *Lactobacillum plantarum***

Nakon tretmana stanica HEp2 s bakterijom *L. plantarum*, optičke gustoće 0,5 u trajanju od 30 minuta, također je ispitan odgovor HEp2 stanica na vezanje bakterija *L. plantarum* proteomskim pristupom. Razlikovnom analizom proteina uočeno je da je u stanicama na koje su vezane bakterije došlo do promjene u ekspresiji 80proteina. Nakon vezanja stanica *L. plantarum* dolazi do smanjene ekspresije proteina odgovornih za imunološki odgovor (Imunoglobulini), također je uočena promjena u građi staničnog skeleta, odnosno došlo je do smanjene ekspresije proteina uključenih u izgradnju mikrofibrila (Actin alpha, Actin prepeptid, Actin-like protein, Putative beta-actin like protein) te mikrotubula (Tubulin beta). Također, povećana je ekspresija proteina odgovornih za obranu stanice od stresnih stanja (Hsp70, Heat shock-induced protein). Vezanjem stanica *L. planatrum* uočena je povećana ekspresija proteina koji sudjeluju u metabolizmu ugljikohidrata (pyruvate kinase, phosphoglycerate kinase) te metabolizmu lipida (Acc2,acetyl-CoA carboxylase, Apolipoprotein L4). Važno je naglasiti da je vezanjem bakterije *L.plantarum* na stanice HEp2 povećana ekspresija proteina koji djeluje na transport kolesterola (Apolipoprotein L4).*L. plantarum*jedna je od najčešćih bakterija mliječne kiseline koja se može naći u fermentiranim namirnicama. Nedavna istraživanja pokazuju da*L. plantarum* ima hipokolesterolemijski učinak na miševima. Mogući mehanizam predlaže da se kolesterol može vezati na stanice bakterija mliječne kiseline ili ga one apsorbiraju, kad su te stanice uzgajane s kolesterolom. Bakterije mliječne kiseline mogu apsorbirati kolesterol i tako prevenirati njegovu apsorpciju natrag u enterohepatičku cirkulaciju (Hwang i sur., 2011).

**Odgovor HEp2 stanica na vezanje kombinacije bakterija *L. plantarum* i *S. enetrica***

Nakon tretmana stanica HEp2 s kombinacijom bakterija *L.plantarum*, optičke gustoće 0,5 i *S.enterica* optičke gustoće 0,75 u vremenu od 30 minuta, ispitan je odgovor HEp2 stanica na vezanje tih bakterija, proteomskim pristupom. Razlikovnom analizom uočeno je da je u stanicama na koje su vezane bakterije došlo do promjene u ekspresiji 81 proteina. Nakon vezanja kombinacije bakterijskih stanica na HEp 2 stanice dolazi do smanjenja ekspresije proteina odgovornih za imunološki odgovor (Imunoglobulini), kao i u slučaju kada su stanice HEp2 tretirane samo bakterijom *L.plantarum*, odnosno samo bakterijom *S.enterica*. Također je uočena promjena u građi staničnog skeleta, odnosno, došlo je do smanjenja ekspresije proteina uključenih u izgradnju mikrofibrila(Actin alpha, Actin prepeptid, Actin-like protein, Putative beta-actin like protein) i mikrotubula (Tubulin alpha, Tubulin beta). Jednake su razlike uočene i kada su stanice HEp2 tretirane svakom bakterijom zasebno. Kao i u prethodna dva slučaja, kada su na stanice HEp2 vezane bakterije *S.eneterica*, odnosno *L.plantarum*, povećana je ekspresija proteina čija je uloga u obrani stanice od stresa ( rcNSEP1, Heat Shock Protein 70kDa).

U slučaju kada je na stanice HEp2 vezana kombinacija bakterija *S.enterica* i *L.plantarum* uočava se povećanje ekspresije proteina koji su uključeni u smatanje proteina.

6**Zaključci**

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Patogena bakterija *Salmonella enterica* optičke gustoće 0,5 i 0,75 tijekom inkubacije u trajanju od pola sata i sat vremena prerasta bakteriju *Lactobacillus plantarum*.
2. Veći rast bakterije *Lactobacillus plantarum* izmjeren je pri optičkoj gustoći 0,5 i 0,75 tijekom inkubacije posttretmanom u trajanju od pola sata.
3. Tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti u uzorcima su detektirane mliječna, octena i propionska kiselina.
4. U uzorcima u kojima su HEp2 stanice tretirane bakterijom *L.plantarum* zabilježena je najmanja koncentracija mliječne kiseline.
5. Najveća proizvodnja octene kiseline zabilježena je u uzorcima u kojim su HEp2 stanice prvo tretirane bakterijom S. enterica OD 0,5 i 0,75, a zatim bakterijom L. plantarum OD 0,5 i 0,75.
6. Koncentracija propionske kiseline najveća je u kontrolnih HEp2 stanica.
7. Vezanjem stanica *L. plantarum* i *S. enterica* smanjena je ekspresija proteina odgovornih za imunološki odgovor stanice, povećana je ekspresija proteina odgovornih za obranu stanice od stresa.
8. Nakon tretmana bakterijom *L. plantarum* uočena je povećana ekspresija proteina koji sudjeluje u transportu kolesterola.

7**Zahvale**

Hvala našoj mentorici izv. prof. dr. sc. Kseniji Durgo na prenesenom znanju i povjerenju koje je imala u nas kada je pristala biti mentoricom. Također, veliko Vam hvala na strpljenju.

Posebno hvala docentici Ani Butorac na strpljenju, upornosti i optimizmu kojim nas je vodila kroz cijeli projekt.

Hvala prof. dr. sc. Jasni Mrvčić i dipl.ing Steli Križanović što su izdvojile vrijeme i pomogle u eksperimentalnom dijelu rada.

Hvala dr.sc. Mariu Cindriću na prenesenom znanju.

8**Popis literature**

Aebersold, R., Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207. doi: 10.1038/nature01511

Andrašević, A, Vranić-Ladavac, M., Tambić Andrašević, A. (2009) Osjetljivost enterobakterija na antibiotike. *Infektološki glasnik* **29**, 171–176.

Anonnymous 1 <http://www.biology-online.org/dictionary/Cell_line?pos=7>, pristupljeno 20. travnja 2015.

Anonnymous 2 (2009) <https://www.bioscience.org/2009/v14/af/3313/fulltext.php?bframe=figures.htm>, pristupljeno 10. travnja 2015.

Anonnymous 4 <http://hrcak.srce.hr/file/120858>, pristupljeno 21. travnja 2015.

Anonnymus 5 (2014) High Performance Liquid Chromatography, <http://www.ux1.eiu.edu/~cfjpb/teaching/ia/iaprojects/hplc.pdf>. Pristupljeno 21. travnja 2015.

Axelsson, L. (2005) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. U: Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspect, (Salminen, S., von Wright, A. i Ouwehand, A., ured.), Marcel Dekker, Inc., New York/Basel, str. 1-66.

Barbau-Piednoir, E., Bertrand, S., Mahillon, J., Roosens, M. H., Botteldoorn, N. (2013) SYBR®Green qPCR *Salmonella* detection system allowing discrimination at the genus, species and subspecies levels. *Appl Microbiol Biotechnol*. **97**, 9811–9824. doi:10.1007/s00253-013-5234-x

Boddicker, J. D., Ledeboer, N. A., Jagnow, J., Jones, B. D., Clegg, S. (2002) Differential binding to and biofilm formation on, HEp-2 cells by *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* is dependent upon allelic variation in the fimH gene of the *fim* gene cluster. *Mol Microbiol* **45**(5), 1255–1265.

Bogovič Matijašić, B., Narat, M., Zorič, M. (2003) Adhesion of *L. gasseri* Strains on Caco-2 Cells.*Food Technol. Biotechnol.* **41**(1) 83–88.

Burgess, R. R., Deutscher, M. P. (2009) Methods in enzymology. Guide to Protein Purification, 2 izd., Elsevier Inc., San Diego, SAD

Canchaya, C., Claesson, M. J., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D., O'Toole, P. W. (2006) Diversity of the genus Lactobacillus revealed by comparative genomics of five species. *Microbiol*. **152**, 3185-3196

Chauviere, G., Coconnier, M. H. L., kerneis, S., fourniat J., servin, A. L. (1992) Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J Gen Microbiol* **138**, 1689-1696.

Cianflone N. F. C. ( 2008) Salmonellosis and the GI Tract: More than Just Peanut Butter. *Curr Gastroenterol Rep*. **10**(4), 424–431.

Cindrić, M., Kraljević, P. S., Horvatić, A., Dodig, I. (2010) Mass spectrometry-based protein indentification. Patent from PCT Int. Appl. WO 2011089453.

Cocchi , M., Lambertini , P., Manzini, D., Marchetti, A., Ulrici, A. (2002) Determination of Carboxylic Acids in Vinegars and in Aceto Balsamico Tradizionale di Modena by HPLC and GC Methods. *J. Agric. Food Chem*. **50**(19), 5255–5261. doi: 10.1021/jf020155l

Desai, P. T., Porwollik, S., Long, F., Cheng, P., Wollam, A., Clifton, S., Weinstock, G.M., McClelland, M. (2013) Evolutionary genomics of the *Salmonella enterica* subspecies. *mBio* **4**(2). doi:10.1128/mBio.00579-12

Dhanani, A. S., Bagchi T. (2013) *Lactobacillus plantarum* CS24.2 prevents *Escherichia coli* adhesion to HT‐29 cells and also down‐regulates enteropathogen‐induced tumor necrosis factor‐a and interleukin‐8 expression. *Microbiol. Immunol*. **57**, 309–315.

Draganov, M. M., Fransazov, S.H., Draganov, D. M., Murdjeva, M. A., Popov, N.K. (2008) Two new serum free and protein free cell strains, derived from Hep2 cell line: cultural conditions and proliferation activity. *J. Cult. Collect*. **6**, 112-121

Ekman, R., Silberring, J., Westman-Brinkmalm, A., Kraj, A. (2009) Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications, John Wiley & Sons, Inc., New York, SAD.

El-Aneed, A., Cohen, A., Banoub, J. (2009) Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Appl. Spectros. Rev.* **44**, 210-230.

Fàbrega, A., Vila, J: (2013) Salmonella enterica Serovar Typhimurium Skills To Succeed in theHost: Virulence and Regulation. *Clin. Microbiol. Rev.* **26** (2), 308–341

Frece, J., Čvek; D., Kovačević, D., Gobin, I., Krcivoj, T., Markov, K. (2010) Karakterizacija bakterijskog soja Lactobacillus plantarum 1K izoliranog iz „slavonskog kulena“ kao probiotičke funkcionalne starter kulture. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu*. **12**, 210-216.

Galić, N., Cindrić, M. (2008) Analiza proteina spektrometrijom masa. *Kem. Ind*. **57** (5), 231-243.

Garrity, G. M., Bell, J. A., Liburn T. G. (2004) Taxonomic outline of the procaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2. izd., Springer, New York/Berlin/Heidelberg, str 7.

Guan, G. F., Zhao, M., Liu, L. M., Jin, C. S., Sun, K., Zhang, D. J., Yu, D. J., Cao, H. W., Lu, Y. Q., Wen, L. J. (2013) Salmonella typhimurium Mediated Delivery of Apoptin in Human Laryngeal Cancer. *Int J Med Sci*. **10**(12): 1639–1648. doi: 10.7150/ijms.6960

Halasz, A. (2009) Lactic Acid Bacteria. U. Food Quality and Standards, 3. izd., (Lasztity, R., ured.), EOLSS Publishers Co Ltd, UK, str. 70-82.

Hwang, C. F., Chen, J. N., Huang, Y. T., Mao, Z. Y (2011) Biomass production of Lactobacillus plantarum LP02 isolated form infant feces whit potentional cholesterol-lowering ability. *Afr. J. Biotechnol.***10** (36), 7010-7120.

Jankowska, A., Laubitz, D., Antushevich, H., Zabielski, R., & Grzesiuk, E. (2008). Competition of Lactobacillus paracasei with Salmonella enterica for adhesion to Caco-2 cells. *BioMed Research International*.

Kandler, O. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**, 209-224

Kersey, P. J., Duarte, J., Williams, A., Karavidopoulou, Y., Birney, E., Apweiler, R. (2004) The International Protein Index : An integrated database for proteomics experiments. *Proteomics* **4**, 1985-1988.

Kisiela, D. I., Kramer, J. J., Tchesnokova, V., Aprikian, P., Yarov-Yarovoy, V., Clegg, S., Sokurenko, E. V. (2011) Allosteric Catch Bond Properties of the FimH Adhesin from *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Biol Chem* **286**(44), 38136–38147. doi: 10.1074/jbc.M111.237511

Klinčić, D., Herceg Romanić, S. (2011) Kemijske metode određivanja hidroksiliranih metabolita policikličkih aromatskih ugljikovodika i poliklorbifenila u biološkome materijalu. *Arth Hig Rada Toksikol*. **62**, 77-89.

Kraljević Pavelić, S., Šaban, N. (2009) Uloga proteomike u otkrivanju novih protutumorskih lijekova. *Medicina* **45**, 211-217.

Kršev, Lj. (1996) Utjecaj bakterija mliječne kiseline na zdravlje ljudi. *Mljekarstvo* **46**, 57-65.

Kršev Lj., Borović, A. (1994) Utjecaj AB-kulture i acidofilnog mlijeka na rast bakterije Escherichia coli. *Mljekarstvo***45** (3), 151-156

Liu, X.F., Bera, T.K., Liu, L.J., Pastan, I. (2009) A primate - specific POTE - actin fusion protein place a role in apoptosis. *Apoptosis***14** (10), 1237-1244

Ljungh, A., Wadström, T. (2006) Lactic Acid Bacteria as Probiotics. *Curr. Issues Intestinal Microbiol*. [online] **7**, 73-90, <http://www.ciim.net>. Pristupljeno 27. travnja 2015.

Ma, B., Zhang, K., Hendrie, C., Liang, C., Li, M., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G. (2003) PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **17**, 2337–2342.

Maassen, C. B. M. (1999) Lactobacilli as anitgen delivery system for mucosal tolerance induction in autoimmune disease. Diplomski rad, Sveučilište u Roterdamu, Roterdam.

Mansoor, M. A. (2002) Liquid Chromatography. Encyclopedia of life sciences [online], <http://www.els.net/>. Pristupljeno 12. travnja 2015.

McPolin, O. (2009) An introduction to HPLC for Pharmaceutical Analysis, Mourne Training services, Warennpoint, 3-20.

Mitev, G. M., Mellbye, B. L., Iversen, P. L., Geller, B. L. (2009) Inhibition of Intracellular Growth of Salmonella enterica Serovar Typhimurium in Tissue Culture by antisense peptide-pfosphorodiamidate morpholino oligomer. *Antimicrob. Agents. Chemoter*. **53**, 3700-3704.

Molin, G. (2001) probiotics in foods not containing milk or milk constituent, whit special reference to Lactobacillus plantarum 299v1,2,3. *Am. J. Clin. Nutr*. **73**, 380-385

Novakova L., Matysova, L., Solich, P. (2006) Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Els.* [online] **68** (1) 908-918. <http://sciencedirect.com/>. Pristupljeno 13. travnja 2015. **!!**

Ohta, K., Kawano, R., Ito, N. (2012) Lactic Acid Bacteria Convert Human Fibroblasts to Multipotent Cells. *PLoS One*. **7**(12). doi: 10.1371/journal.pone.0051866

Perkins, D. N., Pappin, D. J. C., Creasy, D. M., Cottrell, J. S. (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567.

Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P. (2010) Lactic acid bacteria: their antimicrobical compounds and their uses in food production. *Ann. Biol. Res*. [online] 1, 218-228, <http://www.scholarsresearchlibrary.com/>. Pristupljeno 8. travnja 2015.

Rožman M. (2003) Matrix-assisted laser desorption ionization. *Arh Hig Rada Toksikol* 2003; **54**, 19-28.

Schleifer, K. H., Ludwig, W. (1989) Phylogenetic relationships among bacteria. U: The hierarchy of life, (Fernholm, B., Bremer, K. i Jornwall, H., ured.) *Publishers B.V*. [online], 103-117, <http://www.elsevier.com/>. Pristupljeno 8. travnja 2015.

Schmeisser C., Stöckigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K. N., Wenderoth, D. F., Flemming, H.-C., Liesegang, H., Schmitz, R. A., Jaeger, K.-E., Streit, W. R. (2003). Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Appl Environ Microbiol* **69**, 7298–7309.

Settle, F. (1997) Hanbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, Prentice Hall PTR, New Jersey, str. 18-19,24-33, 147-153.

Shay, J. W., Woodring, E. W. (2000) Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Molec. Cell Biol.* **1**, 72-76.

Staley, J. T., Krieg, N. R. (1984) Classification of procaryotic organisms: an overview. U: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (Krieg, N. R. I Holt, J. G., ured.), The Williams & Wilkins Co., Baltimore, str. 1-4.

Šušković, J., Kos, B., Frece, J., Beluhan, S., Matošić, S. (2003) Sinbiotička svojstva *Lactobacillus acidophilus* M92. *Mljekarstvo* **53** (2), 83-110.

Teplitski, M., Al-Agely, A., Ahmer, B. M. M. (2006) Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* **152**(11), 3411-3424. doi: 10.1099/mic.0.29118-0

Vraneš, J., Leskovar, V.(2009) Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija. *Med Glas*. **6**(2):147-164.

Wagner, C., Hensel, M. (2011) Adhesive mechanisms of Salmonella enterica.*Bacterial Adhesion*. Springer Netherlands, 17-34.

Weston, A. D., Hood, L. (2004) Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine. *J. Proteome Res.* **3**, 179-196.

Xu, D., Cisar, J. O., Poly, F., Yang, J., Albanese, J., Dharmasena, M., Wa, T., Guerry, P., Kopeckoa, D. J. (2013) Genome Sequence of *Salmonella enterica* Serovar *Typhi* Oral Vaccine Strain Ty21a. *Genome Announcements* [online] **1**, 1-2, <http://genomea.asm.org/>. Pristupljeno 9. travnja 2015.

Zhang, S., Kingsley, R. A., Santos, R. L., Andrews-Polymenis, H., Raffatellu, M., Figueiredo, J., Nunes, J., Tsolis, R. M., Adams, L. G., Bäumler, A. J. (2003) Molecular Pathogenesis of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium-Induced Diarrhea. *Infect. Immun.* **71**(1), 1-12. doi: 10.1128/IAI.71.1.1-12.2003

9**Sažetak**

Ivana Čigir i Jana Jazbec

*In vitro* funkcionalno djelovanje modificiranih laktobacila iz hrvatskih autohtonih prehrambenih proizvoda na stanične kulture epitela

Enterobakterija *Salmonella enterica* ljudski je patogen i uzrokuje više od milijarde slučajeva salmoneloze godišnje u cijelom svijetu. Međutim, nedavna istraživanja pokazuju kako postoji mogućnost korištenja ovog patogena u borbi protiv tumora.

Bakterije iz roda *Lactobacillus* su poznate probiotičke bakterije koje imaju brojne utjecaje na ljudski organizam. Rod *Lactobacillus* nije patogen, otporan je na kisele uvjete u organizmu te proizvodi antimikrobne spojeve kao što su organske kiseline, vodikov peroksid i bakteriocini.

Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj patogene enterobakterije iz roda *Salmonella* i nepatogenih bakterija Lactobacillus plantatum na metabolizam i ekspresiju proteina humanih stanica HEp2. HEp2 stanice su epitelne humane stanice raka grkljana i često su korištene u biomedicinskim istraživanjima.

Ispitano je kompeticijsko djelovanje enterobakterije i laktobacila na epitelne humane stanice HEp2. Rađena je i analiza organskih kiselina metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti. Proteini su identificirani tandemnom spektrometrijom masa (MS/MS) u pozitivnom načinu rada.

Prema rezultatima dobivenim nakon tretmana stanica HEp2 prvo bakterijom *L. plantarum* u trajanju od pola sata i sat vremena, a nakon toga enterobakterijom *S. enterica*, vidljivo je da dolazi do povećanog rasta patogene bakterije *S.enterica* u odnosu na *L. plantarum* neovisno o početnim optičkim gustoćama bakterija.

Prilikom tretiranja stanica HEp2 prvih pola sata bakterijom *S. enterica*, a nakon toga pola sata bakterijom *L. plantarum*, zabilježen je veći rast *L. plantarum* u odnosu na bakteriju *S. enterica* neovisno o početnim gustoćama.

HPLC metodom u uzorcima su detektirane mliječna, octena i propionska kiselina.

Razlikovnom analizom proteina uočeno je da je u stanicama na koje su vezane bakterije *S.enterica* došlo do povećane ekspresije proteina čija je funkcija obrana stanice od stresnog stanja i povećane ekspresije proteina uključenih u metabolizam ugljikohidrata.

Nakon vezanja stanica *L. plantarum* dolazi do smanjene ekspresije proteina odgovornih za imunološki odgovor, a povećana je ekspresija proteina koji štite stanice od stresnog stanja te proteina uključenih u metabolizam ugljikohidrata, lipida i transport kolesterola.

Prilikom vezanja kombinacije bakterijskih stanica na HEp 2 stanice dolazi do smanjenja ekspresije proteina odgovornih za imunološki odgovor, a povećanja ekspresije heat shock-proteina. Uočeno je i povećanje ekspresije proteina koji su uključeni u smatanje proteina.

Ključne riječi: stanice HEp2, *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella enterica*, kompeticijsko djelovanje, ekspresija proteina

10**Summary**

Ivana Čigir i Jana Jazbec

In vitro functional activity of modified Lactobacillus bacteria on human epithelial larynx carcinoma cells, HEp2

Bacterial strain *Salmonella enterica* is human pathogen which causes several billions of food poisoning worldwide each year. On the other hand, recent data indicate that this pathogen plays significant role in modulation of tumor cells growth.

Bacterial strains from *Lactobacillus* genus are well known probiotic bacteria with multiple effects on human organism. Bacterial strains from *Lactobacillus* genus are not pathogens, but are resistant against acidic conditions, with great ability to produce different antimicrobial compounds like organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins.

The aim of this work was to determine the influence of pathogenic enterobacteria from *Salmonella* genus and nonpathogenic bacteria from *Lactobacillus* genus on metabolism and protein expression in human laryngeal carcinoma cells HEp2. HEp2 cells are epithelial cells often used in biomedicinal research.

Competition for binding to human laryngeal cells among these two stranins was determined, as well as their ability to modulate organic acids production after the binding. Organic acids were determined by HPLC. Differences in protein expression were determined by mass spectrometry (MS/MS).

Pretreatment of laryngeal cells with *L. plantarum* does not decreases the enterobacterial potency to bind to active sites on human laryngeal cells, but it was shown that pretreatment with enterobacteria improves binding potency of *L. plantarum* in all optical densities applied.

HPLC analysis revealed that these two bacterial strains induce production of lactic, acetic and propionic acids.

Protein analysis revealed that bacterial strain *S.enterica* causes increased expression of the proteins which are involved in stress response and carbohydrate metabolism. Probiotic strain *L. plantarum* decreased protein expression involved in immune response, and increased protein expression involved in stress response. This strain also increased expression of the proteins involved in carbohydrate and lipids metabolism, and cholesterol transport.

Combination of these two strains caused decreased expression of proteins involved in immune response and increased expression of the proteins involved in stress response. Also, it was noticed that both, *S. enterica* and *L. plantarum* increased expression of the proteins involved in protein folding.

Keywords: HEp2, *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella enterica,*competition activity, protein expression