

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milica J. Nikolić

**KARAKTERIZACIJA POVRŠINSKIH
MOLEKULA BAKTERIJSKIH ĆELIJA
ODGOVORNIH ZA POTENCIJALNU
PROBIOTIČKU AKTIVNOST PRIRODNIH
IZOLATA LAKTOBACILA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Milica J. Nikolić

**CHARACTERIZATION OF SURFACE
MOLECULES FROM BACTERIAL CELLS
INVOLVED IN THE POTENTIAL
PROBIOTIC ACTIVITY OF NATURAL
LACTOBACILLI ISOLATES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

MENTOR:

Viši naučni saradnik dr **Nataša Golić**,
Univerzitet u Beogradu, Institut za
molekularnu genetiku i genetičko
inženjerstvo

Docent dr **Branko Jovčić**,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Docent dr **Branko Jovčić**,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Viši naučni saradnik dr **Nataša Golić**,
Univerzitet u Beogradu, Institut za
molekularnu genetiku i genetičko
inženjerstvo

Naučni savetnik dr **Milan Kojić**,
Univerzitet u Beogradu, Institut za
molekularnu genetiku i genetičko
inženjerstvo

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Jedan deo teze je urađen u Instituto de Productos Lacteos de Asturias - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Španija.

Ovom prilikom bih se zahvalila.:

prof. dr Ljubiši Topisiroviću na ukazanom poverenju još od početka rada u Institutu, uveo me je u područje istraživanja molekularne genetike mikroorganizama i korisnim savetima upoznao sa načinom razmišljanja i planiranja eksperimenata;

dr Milanu Kojiću koji je nesebično pomagao i delio svoje iskustvo i savete kad god mi je to bilo potrebno, bez njegove pomoći jedan značajan deo teze ne bi bio toliko uspešno urađen i analiziran. Takođe, zahvaljujem mu se i za kritičku ocenu rada;

dr Nataši Golić korisnim diskusijama i savetima bez kojih ne bi bio uspešna izrada mog eksperimentalnog rada, što me je uputila na saradnju sa Patricijom Ruas - Madiedo iz IPLA-CSIC i sa puno strpljenja pomogla kad god to bilo potrebno, a zahvalnost joj dugujem i za kritičku ocenu rada;

dr Branku Jovčiću na savetima, korisnim idejama kao i na kritičkoj oceni rada,

Grupi za probiotike, prebiotike i egzopolisaharide iz IPLA-CSIC u kojoj je urađen značajan deo teze, gde mi je u svakom trenutku pružena nesebična pomoć oko planiranja i izrade eksperimenata, gde sam stekla nova iskustva sa tehnikama sa kojima sam se po prvi put srela. Hvala pre svega Patri Ruas - Madiedo kao i Clari, Miguelu, Abelardu, Borji, Nuriji, Claudiju, Mariji i svim saradnicima iz IPLA-CSIC. Muchas gracias a tod@s!

Svojim dragim kolegama iz lab 6: Ivani, Amareli, Đorđu, Jeleni, Jelki, Sanji kao i svim mlađim kolegama (Brankici, Jovanki, Sanjici, Goranu, Goci i Mariji) dugujem zahvalnost na podršci u savladavanju svih prepreka u eksperimentima; hvala Maji i Kaći na svakodnevnoj pozitivnoj energiji!

kolegama dr Ivani Gađanski i dr Đorđu Miljkoviću na savetima i sugestijama u oblastima u kojima su iskusniji od mene.

Posebno se zahvaljujem svojoj dragoj porodici na neizmernoj podršci, ljubavi i strpljenju u svakom trenutku dinamičnog života!

Karakterizacija površinskih molekula bakterijskih ćelija odgovornih za potencijalnu probiotičku aktivnost prirodnih izolata laktobacila

REZIME

Probiotički potencijal bakterija u velikoj meri zavisi od površinskih karakteristika bakterijske ćelije. Stoga su u ovom radu analizirane površinske komponente ćelija odgovorne za agregacione sposobnosti i produkciju egzopolisaharida (EPS) prirodnih izolata laktobacila. Sojevi laktobacila korišćeni u ovom radu su izolovani iz autohtonih sireva proizvedenih u domaćinstvima prema tradicionalnoj tehnologiji. Odabrani laktobacili koji su ispoljavali autoagregaciju (BGAR75, BGGR2-68, BGGR2-82, BGDP9-85, BGDP1-84, BGNJ1-3, BGNJ1-61, BGNJ1-70), kao i dva odabrana soja koja ne agregiraju (BGAR76 i BGGR2-20), su klasifikovani na osnovu poređenja nukleotidnih sekvenci gena za 16S rRNK sa NCBI bazom podataka i svrstani u grupu *Lactobacillus casei*. Soj BGDU4-71 je determinisan sekvenciranjem 16S rDNK kao *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, a soj BGCG11, proizvođač egzopolisaharida (EPS-CG11), je determinisan AFLP metodom kao *Lactobacillus paraplantarum*. U cilju karakterizacije faktora uključenih u proces agregacije u ovom radu su analizirani brzina i tip autoagregacije. Brzina autoagregacije (utvrđivana spektrofotometrijski) kao i oblik agregata su varirali kod sojeva. Najbrže su agregirali i formirali najkrupnije agregate sojevi BGSJ2-8, BGDP1-84 i BGNJ1-6. Karakterizacija prirode faktora koji utiču na sposobnost autoagregacije izabranih sojeva laktobacila je rađena intenzivnim pranjem sojeva koji agregiraju u bidestilovanoj vodi i u PBS rastvoru. Uočeno je da se autoagregacija gubila intenzivnim pranjem u bidestilovanoj vodi kod svih sojeva, osim kod BGDP1-84, na osnovu čega je zaključeno da je prisustvo jona neophodno za formiranje agregata. Osim toga, pokazano je da su neki od faktora autoagregacije proteinske prirode s obzirom da se ova karakteristika gubila nakon tretmana proteinazom *K. Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 je formirao koagregate sa *Listeria innocua* ATCC33090, *Escherichia coli* ATCC25922 ili sa *Salmonella enterica* ser. Typhimurium TR251, dok njegov derivat BGSJ2-81 koji je izgubio sposobnost autoagregacije nije koagregirao. Spektrofotometrijsko

praćenje ovih interakcija je pokazalo da je nakon tretmana proteinazom K koagregacija bila narušena, što ukazuje da su u proces koagregacije, kao i autoagregacije, uključeni faktori proteinske prirode. Analiza površinskih karakteristika sojeva koji autoagregiraju metodom adhezije za heksadekan, pokazala je da svi sojevi koji imaju sposobnost autoagregacije ispoljavaju visoku hidrofobnost ćelijske površine, dok je u sojevima (kao i derivatu BGSJ2-81) koji ne agregiraju ćelijska površina hidrofilna. Drugi deo rada je obuhvatao analizu probiotičkog potencijala soja *Lb. paraplantarum* BGCG11, producenta egzopolisaharida EPS-CG11 u *in vitro* modelima. U radu su takođe korišćeni i Muc⁻ derivati soja BGCG11 (NB1, NB4, NB16), dobijeni čišćenjem plazmida tretmanom novobiocinom. Pomenuti derivati produkuju znatno manje EPS-a različitog sastava od EPS-CG11. Analiza preživljavanja simuliranog prolaska kroz gastrointestinalni trakt (GIT) kao i adhezija za tri ćelijske linije (Caco-2, HT29, HT29-MTX) je rađena brojanjem kolonija pre i nakon tretmana/interakcije i određivanjem procenta preživljavanja/adhezije u odnosu na početni broj bakterija. BGCG11 i Muc⁻ derivati (NB1, NB4, NB16) su preživljavali (1-2%) simulirani prolazak kroz (GIT) ukoliko su bili resuspendovani u 10% obranom mleku. EPS-CG11 je izolovan i prečišćen iz supernatanta kulture BGCG11 gajene u minimalnom medijumu sa glukozom kao jedinim izvorom šećera. HPLC metodom sa MALLS detektorom je praćena promena molarne mase i količine EPS-CG11 polimera nakon simulirane digestije kroz želudačni i crevni sok. Rezultati su pokazali da su masa i količina EPS-CG11 ostale nepromenjene, što znači da enzimi GIT ne utiču na stabilnost prečišćenog EPS-CG11. Tokom testiranja sposobnosti adhezije za ćelijske linije soj BGCG11, kao i kontrolni probiotički soj *Lb. rhamnosus* GG, su pokazali sličan procenat adhezije, dok su se Muc⁻ derivati NB1, NB4 i NB16 statistički značajnije vezivali u većem procentu za sve tri ćelijske linije. Svi testirani sojevi laktobacila su pokazali veoma nizak procenat adhezije za HT29-MTX ćelijsku liniju, što je najverovatnije posledica prisustva mukusne barijere (HT29-MTX ćelijska linija, za razliku od Caco-2 i HT29, produkuje mucine). Probiotički potencijal soja BGCG11 je takođe praćen *in vitro* analizom indukcije imunog odgovora limfocita periferne krvi dobrovoljnih davalaca u prisustvu mrtvih ćelija BGCG11, Muc⁻ derivata i prečišćenog EPS-CG11. Imuni odgovor limfocita je praćen preko proliferacije limfocita (korišćenjem kita za proliferaciju) i produkcije citokina (IFN γ , TNF α , IL-12, IL-10, IL-1 β i IL-17) metodom protočne citometrije. Zapaženo je da su

limfociti periferne krvi proliferisali u prisustvu laktobacila (BGCG11 i Muc⁻ derivata NB1, NB4 i NB16) dok EPS-CG11 nije uticao na proliferaciju limfocita, što znači da su neki drugi molekuli, a ne EPS zaslužni za proliferaciju limfocita. Kad se gleda generalno tip imunog odgovora koji izaziva u prisustvu mrtvih laktobacila, može se reći da je prisustvo soja BGCG11 i EPS-CG11 (u koncentraciji od 100 µg/ml) indukovalo anti-inflamatorni i pro-Th17 odgovor, dok su Muc⁻ derivati NB1, NB4 i NB16 indukovali inflamatorni odgovor limfocita. Dalje je rađena detaljnija analiza uticaja potencijalnih patogenih mikroorganizama, samih ili u koinkubaciji sa BGCG11, derivatom NB1 i EPS-CG11 na HT29-MTX ćelijsku liniju. Analiziran je citotoksični efekat na HT29-MTX ćelije (meranjem nivoa aktivnosti laktat dehidrogenaze) i nivo produkcije IL-8 (metodom ELISA). Rezultati su poređeni sa efektom koji izaziva *Lb. rhamnosus* GG i njegov izolovan i prečišćen EPS-GG u istim uslovima testiranja. Od patogenih bakterija samo je *Listeria monocytogenes* LMG13305 izazivala značajniju lizu ćelija, a taj nivo citotoksičnog efekta u HT29-MTX ćelijama je bio smanjen nakon koinkubacije *L. monocytogenes* LMG13305 sa EPS-CG11. Nivo produkcije IL-8 u HT29-MTX ćelijama nakon koinkubacije patogenih sojeva sa laktobacilima (BGCG11, Muc⁻ derivat NB1 i *Lb. rhamnosus* GG) ili sa EPS molekulina (EPS-CG11 ili EPS-GG) je bio različit u odnosu na inkubaciju samo sa patogenim sojevima. BGCG11 i NB1 značajno povećavaju indukciju IL-8 u prisustvu *Salmonella enterica* ser. Thyphymurium LMG15660, *Shigella sonnei* LMG10473 i *Yersinia enterocolitica* LMG7899. Samo je BGCG11 značajno povećao IL-8 u koinkubaciji sa *L. monocytogenes* LMG13305. EPS-CG11 je snizio nivo ovog citokina u koinkubaciji sa *L. monocytogenes* LMG13305, a oba tipa EPS molekula (EPS-CG11 i EPS-GG) su značajno smanjili nivo produkcije IL-8 u koinkubaciji sa *Clostridium difficile* LMG21717. Može se zaključiti da različiti molekuli sa površine kako samih patogena, tako i laktobacila modifikuju nespecifični imuni odgovor HT29-MTX ćelijske linije, dok prisustvo prečišćenih EPS molekula uglavnom stišava taj odgovor, a važno je reći da se razlikuje efekat EPS-CG11 i EPS-GG polimera, kao i *Lb. rhamnosus* GG u odnosu na *Lb. paraplantarum* BGCG11. Na kraju, u ovom radu je lokalizovan i okarakterisan potencijalni operon EPS-CG11. Tehnikama molekularne genetike (kloniranjem, sekvenciranjem, DNK-DNK hibridizacijom) iz plazmidne DNK soja BGCG11 dobijeno je 26463 bp sekvence velikog plazmida pCG1, koji nedostaje Muc⁻ derivatima. Na ovom plazmidu je lokalizovan

potencijalni operon EPS-CG11: region od oko 15 kb sa 15 otvorenih okvira čitanja (ORF – “open reading frame“). Na osnovu homologije aminokiselinske sekvence ORF-ovi su identifikovani kao: primarna glikoziltransferaza (ORF 1), glikoziltransferaze (ORF 2, 3, 4, 5 i ORF 8), polisaharid polimeraze (ORF 6 i 7), regulatori dužine lanca polisaharida (ORF 9, 10 i 11) i regulatori biosinteze EPS-a (ORF 10 i 11). Nizvodno od pomenutih ORF-ova je transpozaza, dok su ORF 13, 14, 15 i 16 pokazali homologiju na aminokiselinskom nivou sa proteinima koji sintetišu dTDP-ramnozu (geni *rfbACBD*) koja ulazi u sastav EPS-CG11. Na ovaj način je dobijena nova i originalna struktura genskog operona EPS-CG11, koji je po prvi put okarakterisan u vrsti *Lactobacillus paraplantarum*, koji je specifičan po svojoj plazmidnoj lokalizaciji.

Ključne reči: *Lactobacillus*, probiotik, agregacija, egzopolisaharid (EPS), interakcije bakterija sa ćelijama u kulturi, limfociti, plazmid, operon.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna genetika i genetičko inženjerstvo

UDK broj: 579.61(043.3)

Characterization of surface molecules from bacterial cells involved in the potential probiotic activity of natural lactobacilli isolates

SUMMARY

The probiotic potential of bacteria depends on the surface characteristics of bacterial cells. Keeping this in mind, in this work the surface components of the cells responsible for the aggregation ability and the production of exopolysaccharides (EPS) were analyzed from the natural isolates of lactobacilli. Lactobacilli strains used in this work were isolated from autochthonous cheeses produced in households according to the traditional technology. Selected lactobacilli showing the autoaggregation ability (BGAR75, BGGR2-68, BGGR2-82, BGD9-85, BGD1-84, BGNJ1-3, BGNJ1-61, BGNJ1-70) as well as two selected strains which do not form aggregates (BGAR76 and BGGR2-20) according to the comparison of their 16S rRNA gene sequence to the NCBI database were classified in the group *Lactobacillus casei*. The strain BGDU4-71 using the 16S rRNA gene sequence was determined as *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and the strain BGCG11, the producer of the exopolysaccharide (EPS-CG11), was determined by AFLP methodology as *Lactobacillus paraplantarum*. In order to characterize factors involved in the aggregation process the kinetics and the type of autoaggregation were analyzed. The kinetics (spectrophotometrically determined) as well as the shape of the aggregates was variable among the strains. Strains with fastest and the largest aggregates were BGSJ2-8, BGD1-84 and BGNJ1-6. The characterization of the nature of factors involved in autoaggregation of selected strains of lactobacilli was performed by exhaustive washing of the strains in distilled water and in PBS solution. It was noticed that the autoaggregation ability was lost after exhaustive washing in distilled water in all tested strains except BGD1-84, which led to the conclusion that the presence of some ions was necessary for the formation of the aggregates. Besides, it was shown that some of the factors promoting autoaggregation were of proteinaceous nature, since the ability was lost after the proteinase K treatment. *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 was able to form coaggregates with *Listeria innocua* ATCC33090, *Escherichia coli* ATCC25922 or with *Salmonella enterica* ser. Typhimurium

TR251, while its derivative BGSJ2-81 that was not able to autoaggregate, did not show coaggregation. Spectrophotometrical measurements of the interaction showed that the coaggregation was disturbed after proteinase K treatment, which indicated that coaggregation, as well as the autoaggregation, involve some factors with proteinaceous nature. The analysis of the surface characteristics of strains showing autoaggregation by hexadecane adhesion method showed that all strains with the autoaggregation ability were highly hydrophobic, while the ones that do not aggregate (as well as for the derivative BGSJ2-81) have hydrophilic cell surface. The other part of the work was including the analysis of the probiotic potential of the strain *Lb. paraplantarum* BGCG11, which produces exopolysaccharide EPS-CG11, in *in vitro* model systems. In this part of the work, the Muc⁻ derivatives from the strain BGCG11 (NB1, NB4, NB16), obtained by novobiocin plasmid curing, were included in analyses. The derivatives produce significantly lower amount of EPS that differs from EPS-CG11 in composition. The analysis of survival in simulated transit through gastrointestinal tract (GIT), as well as the adhesion to three cell lines (Caco-2, HT29, HT29-MTX) were performed by counting of bacterial colonies before and after the treatment/interaction and the percentage of survival/adhesion was calculated referring to the number of bacteria before the incubation with cell lines. BGCG11 and Muc⁻ derivatives (NB1, NB4 and NB16), resuspended in 10% skimmed milk, survived (1-2%) the simulated GIT transit. The EPS-CG11 was isolated and purified from the supernatant of the liquid BGCG11 culture, cultivated in minimal media with glucose as the only sugar source. HPLC method with MALLS detector was used to monitor the change in molar mass and the amount of EPS-CG11 polymer after simulated transit through gastric and intestinal digestion. Obtained results showed that the molar mass and the amount of EPS-CG11 remained unchanged, indicating that the enzymes in GIT did not affect the stability of the purified EPS-CG11. Testing of the adhesion ability of BGCG11, as well as the control probiotic strain *Lb. rhamnosus* GG, showed similar percentage of adhesion for these two lactobacilli, while Muc⁻ derivatives NB1, NB4 and NB16 expressed statistically significant higher percentage of adhesion to all three cell lines. All tested strains showed very low percentage of adhesion to HT29-MTX cell line, what is the most likely due to the presence of the mucus barrier (HT29-MTX cell line, produces mucins, while Caco-2 cells do not). The probiotic potential of the strain BGCG11 was also monitored by *in vitro*

analysis of the induction of the immune response in the presence of UV-inactivated bacteria (BGCG11, Muc⁻ derivatives) and purified EPS-CG11, in human peripheral blood lymphocytes (PBLs) isolated from healthy volunteers. The immune response was monitored by the proliferation of PBLs (by using kit for the proliferation measurement) and the cytokine production (IFN γ , TNF α , IL-12, IL-10, IL-1 β and IL-17) by flow cytometry. It was noticed that PBLs proliferated in the presence of lactobacilli (BGCG11 and Muc⁻ derivatives NB1, NB4 and NB16), while EPS-CG11 did not affect to the proliferation of PBLs, which led to the conclusion that some other molecules, rather than EPS were involved in inducing of the proliferation. Generally analyzing the type of the immune response, the presence of BGCG11 and the EPS-CG11 (in concentration of 100 μ g/ml) induced anti-inflammatory and a pro-Th17 response, while Muc⁻ derivatives NB1, NB4 and NB16 induced inflammatory response in PBLs. Furthermore, the detailed analysis of the influence of potential pathogenic microorganisms, alone or in coincubation with BGCG11, derivative NB1 and EPS-CG11, on HT29-MTX cell line was performed. The cytotoxic effect in HT29-MTX cell line (performed by measurement of the lactate dehydrogenase activity) and the analysis of the production IL-8 (by ELISA method) was performed. Obtained results were compared to the effects of *Lb. rhamnosus* GG and its isolated and purified EPS-GG in the same experimental conditions. From all tested pathogens, only *Listeria monocytogenes* LMG13305 induced significant cell lyses in HT29-MTX cells, which was reduced after coincubation of *L. monocytogenes* LMG13305 with EPS-CG11. The level of the IL-8 production in HT29-MTX cells after coincubation of pathogens with lactobacilli (BGCG11, Muc⁻ derivative NB1 and *Lb. rhamnosus* GG) or with EPS molecules (EPS-CG11 or EPS-GG) was different in comparison to levels obtained after incubation only with pathogenic strains. BGCG11 and NB1 induced significantly higher level of IL-8 in the presence of *Salmonella enterica* ser. Thyphimurium LMG15660, *Shigella sonnei* LMG10473 and *Yersinia enterocolitica* LMG7899. In coincubation with *L. monocytogenes* LMG13305, only BGCG11 increased the level of IL-8 production. EPS-CG11 decreased the level of this cytokine in coincubation with *L. monocytogenes* LMG13305, while both type of EPS molecules (EPS-CG11 and EPS-GG) significantly decreased the IL-8 production in coincubation with *Clostridium difficile* LMG21717. The conclusion is that different molecules from the cell surface of

pathogens, and lactobacilli modify nonspecific immune response of HT29-MTX cell line, while the presence of purified EPS molecules showed silencing of this response. Hence, it is important to see whether the effects of EPS-CG11 and EPS-GG are different, since the difference was seen when *Lb. rhamnosus* GG and *Lb. paraplantarum* BGCG11 strains were. At the end of this work, the potential EPS-CG11 operon was localized and characterized. Using techniques of molecular genetics (cloning, sequencing, DNA-DNA hybridization) 26463 bp of the sequence of large plasmid pCG1, lacking in Muc⁻ derivatives, were obtained. In this plasmid the potential operon EPS-CG11 was localized: the region of 15 kb with 15 open reading frames (ORFs). Based on the amino acid sequence homology these ORFs were identified as: the priming glycosyltransferase (ORF 1), glycosyltransferases (ORF 2, 3, 4, 5 and ORF 8), polysaccharide polymerases (ORF 6 and 7), chain length determinators (ORF 9, 10 and 11) and the EPS biosynthesis regulators (ORF 10 and 11). Downstream from these ORFs was the transposase, while ORF 13, 14, 15 and 16 showed homology at the amino acid level with proteins involved in synthesis of dTDP-rhamnose (*rfbACBD* genes) that is a part of the EPS-CG11 composition. In this way, the new and original structure of the EPS-CG11 gene operon was for the first time characterized in *Lactobacillus paraplantarum* species. Moreover, this operon is also specific by its plasmid localization.

Key words: *Lactobacillus*, probiotic, aggregation, exopolysaccharide (EPS), interaction of bacteria with cell cultures, lymphocytes, plasmid, operon.

Scientific field: Biology

Specific topic: Molecular genetics and genetic engineering

UDC number: 579.61(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1.
1.1. Bakterije mlečne kiseline - laktobacili.....	1.
1.2. Probiotici.....	2.
1.3. Primeri primene probiotika za poboljšanje stanja organizma kod zdravstvenih problema ljudi.....	5.
1.4. Površinske karakteristike laktobacila.....	8.
1.4.1. Površinski proteini.....	8.
1.4.2. Faktori adhezije laktobacila za GIT čoveka.....	10.
1.4.3. Sposobnost agregacije kod laktobacila.....	11.
1.4.4. Egzopolisaharidi laktobacila.....	12.
1.5. Imuni sistem čoveka - citokini.....	17.
1.6. Uticaj laktobacila na imuni sistem čovekovog GIT-a.....	20.
1.7. Prirodni izolati laktobacila.....	22.
2. CILJ.....	25.
3. MATERIJAL I METODE.....	26.
3.1. Bakterijski sojevi.....	26.
3.2. Korišćeni plazmidi.....	27.
3.3. Podloge za rast bakterija.....	27.
3.4. Metode izolacije DNK.....	28.
3.4.1. Metoda izolacije ukupne DNK iz laktobacila.....	28.
3.4.2. Izolacija velikih količina plazmidne DNK iz laktobacila.....	29.
3.4.3. Prečišćavanje DNK u gradijentu CsCl.....	29.
3.4.4. Metode izolacije velike količine plazmidne DNK iz <i>E. coli</i>	30.
3.4.5. Mini-metoda za izolaciju plazmidne DNK iz <i>E. coli</i>	30.

3.5. Enzimske reakcije sa DNK.....	30.
3.5.1. Umnožavanje DNK fragmenta PCR metodom ("Polymerase Chain Reaction").....	30.
3.5.2. Sečenje restrikcionim enzimima.....	31.
3.5.3. Defosforilacija 5' slobodnih krajeva DNK fragmenata.....	31.
3.5.4. Ligacija DNK fragmenata.....	31.
3.6. DNK-DNK hibridizacija.....	32.
3.6.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane.....	32.
3.6.2. Obeležavanje DNK probe digoksinom.....	33.
3.6.3. Neradioaktivna DNK-DNK hibridizacija.....	33.
3.7. Transformacija <i>E. coli</i> DH5 α ćelija.....	34.
3.7.1. Priprema kompetentnih <i>E. coli</i> DH5 α ćelija.....	34.
3.7.2. Transformacija kompetentnih <i>E. coli</i> DH5 α ćelija ćelija temperaturnim šokom ("Heat shock").....	34.
3.8. Elektroforeza DNK.....	35.
3.9. Elucija DNK fragmenata.....	35.
3.10. Metode analize agregacije i površinskih karakteristika odabranih laktobacila.....	35.
3.10.1. Kinetika agregacije.....	35.
3.10.2. Određivanje prirode faktora koji učestvuju u agregaciji.....	36.
3.10.3. Analiza površinskih karakteristika laktobacila - adhezija za heksadekan.....	36.
3.11. Analiza soja <i>Lactobacillus paraplantarum</i> BGCG11 kao potencijalnog probiotika.....	36.
3.11.1. Izolacija i prečišćavanje egzopolisaharida EPS-CG11.....	36.
3.11.2. Preživljavanje EPS producenta BGCG11 i njegovih derivata i stabilnost prečišćenog EPS-CG11 u simuliranim uslovima prolaska kroz gastrointestinalni trakt (GIT).....	37.
3.11.3. Adhezija <i>Lb. paraplantarum</i> BGCG11 i derivata za intestinalne ćelijske linije.....	39.
3.11.4. Proliferacija i produkcija citokina u leukocitima iz periferne krvi (LPK) u prisustvu mrtvih bakterija ili prečišćenog EPS-CG11.....	40.

3.11.5. Adhezija patogenih sojeva za HT29-MTX i praćenje efekta koinkubacije patogena sa sojem BGCG11, derivatom NB1 i sojem <i>Lb. rhamnosus</i> GG ili sa EPS molekulima.....	41.
3.11.5.1. Citotoksični efekat patogenih bakterija na HT29-MTX.....	41.
3.11.5.2. Merenje produkcije IL-8 u HT29-MTX ćelijskoj liniji nakon interakcije sa bakterijama ili EPS polimerima.....	42.
3.11.6. Statistička analiza.....	42.
4. REZULTATI.....	43.
4.1. Identifikacija izolata i derivata korišćenih u radu.....	43.
4.2. Autoagregacija izabranih sojeva laktobacila.....	44.
4.2.1. Karakterizacija prirode faktora koji utiču na sposobnost autoagregacije izabranih sojeva laktobacila.....	45.
4.2.2. Karakterizacija prirode faktora koji utiču na sposobnost koagregacije soja <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> BGSJ2-8 sa drugim vrstama bakterija.....	46.
4.2.3. Analiza površinskih osobina odabranih sojeva laktobacila - adhezija za heksadekan.....	48.
4.3. Analiza soja <i>Lactobacillus paraplantarum</i> BGCG11, producenta EPS-CG11 kao potencijalnog probiotika.....	49.
4.3.1. Preživljavanje EPS producenta BGCG11 i Muc ⁻ derivata NB1, NB4, NB16 koji su izgubili rastegljiv fenotip pod simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta (GIT).....	49.
4.3.2. Stabilnost prečišćenog EPS-CG11 u uslovima simuliranog prolaska kroz GIT	51.
4.3.3. Adhezija BGCG11 soja i derivata NB1, NB4 i NB16 za epitelijalne intestinalne ćelijske linije.....	52.
4.3.4. <i>In vitro</i> odgovor limfocita iz periferne krvi u prisustvu BGCG11, Muc ⁻ derivata i prečišćenog EPS-CG11.....	53.
4.3.4.1. Proliferacija limfocita iz periferne krvi u prisustvu BGCG11, Muc ⁻ derivata i prečišćenog EPS-CG11.....	54.
4.3.4.2. Produkcija citokina limfocita iz periferne krvi u prisustvu BGCG11, Muc ⁻ derivata i prečišćenog EPS-CG11.....	55.
4.3.5. Analiza uticaja soja BGCG11 na HT29-MTX ćelijsku liniju u prisustvu patogenih mikroorganizama.....	59.

4.3.5.1. Analiza citotoksičnog efekta patogenih bakterija na HT29-MTX ćelije.....	59.
4.3.5.2. Analiza nivoa produkcije IL-8 u HT29-MTX ćelijskoj liniji u prisustvu različitih patogena i laktobacila.....	60.
4.4. Lokalizacija gena potencijalno odgovornih za sintezu EPS-CG11 i organizacija EPS operona u soju <i>Lb. paraplantarum</i> BGCG11.....	64.
4.4.1. Kloniranje i sekvenciranje 26463 bp poreklom sa pCG1 plazmida soja BGCG11.....	64.
4.4.2. Analiza DNK sekvence EPS operona soja BGCG11.....	68.
5. DISKUSIJA.....	79.
5.1. Analiza agregacije odabranih sojeva laktobacila.....	80.
5.2. Analiza probiotičkog potencijala soja <i>Lactobacillus paraplantarum</i> BGCG11, producenta heteropolisaharida.....	83.
6. ZAKLJUČCI.....	98.
7. LITERATURA.....	101.
PRILOG A.....	118.

Korišćene skraćenice naziva rodova bakterija u radu:

B. - Bifidobacterium

Cl. - Clostridium

Cr. - Cronobacter

E. - Escherichia

H. - Helicobacter

Lb. - Lactobacillus

Lc. - Lactococcus

L. - Listeria

S. - Salmonella

Sh. - Shigella

St. - Streptococcus

Y. - Yersinia

1. UVOD

1.1. Bakterije mlečne kiseline – laktobacili

Bakterije mlečne kiseline (BMK) predstavljaju heterogenu grupu mikroorganizama čija je glavna karakteristika sinteza mlečne kiseline iz laktoze. BMK su auksotrofi i za svoj rast zahtevaju bogate podloge, koje sadrže vitamine (riboflavina, pantotenske i folne kiseline, biotina i tiamina) i aminokiseline. U prirodi, BMK su široko rasprostranjene kao deo epifitne mikroflore na biljkama, članovi su kompleksnih zajednica mikroorganizama usne duplje, gastrointestinalnog trakta i vagine sisara. Grupa BMK uključuje sledeće rodove: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella* (Axelsson, 2004). U industriji mleka i fermentisanih mlečnih proizvoda najčešće se koriste rodovi: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* i *Leuconostoc*.

Rod *Lactobacillus* je široka i heterogena taksonomska jedinica, sačinjena od preko 100 vrsta koje se razlikuju po fenotipskim, biohemijskim i fiziološkim osobinama. Laktobacili su BMK štapićastog oblika koji su nepokretni i ne formiraju spore. Ovaj rod BMK se može podeliti u tri grupe, na osnovu prisustva ili odsustva ključnih enzima u metabolizmu šećera. Kandler i Weiss (1986) su dali sledeću podelu:

1. Obligatno homofermentativni laktobacili, koji fermentišu heksoze do mlečne kiseline, dok pentoze i glukonat ne fermentišu. Predstavnici ove grupe su: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* i *Lactobacillus helveticus*;
2. Fakultativno heterofermentativni laktobacili, koji fermentišu heksoze do mlečne kiseline, mogu da proizvode gas iz glukonata, ali ne iz glukoze. Predstavnici ove grupe su: *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus plantarum*;
3. Obligatno heterofermentativni laktobacili, koji fermentišu heksoze do mlečne i sirćetne kiseline, etanola i ugljendioksida. Predstavnici ove grupe su: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus buchneri* i *Lactobacillus fructosus*.

Laktobacili su acidofilne ili acidotolerantne bakterije. Neke od vrsta ovog roda imaju dugu istoriju korišćenja u industriji i poljoprivredi: koriste se kao starter kulture za dobijanje fermentisanih mlečnih proizvoda, fermentisanih proizvoda od mesa, fermentisanog povrća i kiselog testa. Kao starter kulture za dobijanje fermentisanih proizvoda se prvenstveno koriste homofermentativni laktobacili. Obligatno heterofermentativni laktobacili zbog produkcije CO₂ i alkohola utiču na smanjenje kvaliteta fermentisanih mlečnih proizvoda.

U gastrointestinalnom traktu čoveka (GIT) laktobacili čine 0,01 do 0,6% od ukupnog broja fekalnih mikroorganizama. Predominantne autohtone vrste GIT su *Lb. gasseri*, *Lb. reuteri*, *Lb. crispatus*, *Lb. salivarius*, i *Lb. ruminis*, takođe se u humanom GIT-u mogu naći *Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. curvatus*, i *Lb. sakei* (Lebeer et al., 2008). Najveći broj vrsta laktobacila se ne smatra patogenima, i imaju GRAS (“generally recognized as safe“) status. Osim toga, EFSA (“European food safety authority“) je razvila QPS (“qualified presumption of safety“) sistem, pomoću koga se vrši procena sigurnosti mikroorganizama koji se namerno unose u lanac ishrane. QPS status imaju sledeće vrste laktobacila: *Lb. acidophilus*, *Lb. amylolyticus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. alimentarius*, *Lb. aviaries*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. casei*, *Lb. cellobiosus*, *Lb. collinoides*, *Lb. coryniformis*, *Lb. crispatus*, *Lb. curvatus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. farciminis*, *Lb. fermentum*, *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri*, *Lb. helveticus*, *Lb. hilgardii*, *Lb. johnsonii*, *Lb. kefiranoferens*, *Lb. kefir*, *Lb. mucosae*, *Lb. panis*, *Lb. paracasei*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. pontis*, *Lb. reuteri*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. sakei*, *Lb. salivarius*, *Lb. sanfranciscensis*, i *Lb. zae* (EFSA, 2009).

1.2. Probiotici

Veliki broj vrsta bakterija su komensalni stanovnici ljudskog tela. Neke od njih, kao što su bakterije gastrointestinalnog trakta, koegzistiraju sa domaćinom u obostrano korisnom odnosu (GIT ljudi sadrži više od 400 bakterijskih vrsta) (Tannock, 1999). Od toga, želudac sadrži mali broj bakterija (10³ CFU/ml želudačnog soka), dok broj bakterija raste u debelom crevu do finalne koncentracije od 10¹² bakterija/g. Kolonizacija GIT-a bakterijama počinje pri rođenju i nastavlja se tokom celog života (Mitsuoka, 1992). Još početkom XX

veka Ilja Iljič Mečnikov, ruski dobitnik Nobelove nagrade, je smatrao da od hrane koju unosimo zavise i intestinalni mikroorganizmi, što nam omogućava da ishranom modifikujemo GIT mikrofloru i da zamenimo loše mikrobe korisnim. U isto vreme, francuski pedijatar Anri Tisije (Henry Tissier) je uočio da deca sa dijarejom, za razliku od zdrave dece, imaju u svojoj stolici manjak bakterija sa "Y" oblikom, tzv. "bifid" oblik. Tisije je sugerisao da konzumacijom ovih bakterija može da se restaurira crevna mikroflora.

U novije vreme uveden je termin probiotici koji definiše žive organizme koji doprinose poboljšanju zdravstvenog statusa domaćina, ako se unesu u odgovorajućim količinama (Guarner and Schaafsma, 1998; FAO-WHO, 2006). Da bi se koristili u hrani, probiotici moraju ne samo da prežive, već i da rastu i da se razmnožavaju u GIT-u. Usled toga moraju da budu tolerantni na nisku vrednost pH, da budu rezistentni na želudačni sok i da rastu u prisustvu žučnih soli (u uslovima koji vladaju u GIT-u), ili da se unose u preparatima koji im omogućavaju da prežive prolazak kroz GIT. Do danas opisani probiotici su najčešće Gram-pozitivne bakterije i to uglavnom predstavnici rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, mada i kvasac *Saccharomyces boulardii* ima status probiotika (Holzapel et al., 1998; Klein et al., 1998; Czerucka et al., 2007).

Da bi se neki soj okarakterisao kao probiotik, potrebno je nedvosmisleno pokazati da ispoljava pozitivan efekat na zdravlje tokom rasta i aktivnosti u ljudskom telu (Morelli, 2000). Pre korišćenja bilo kog probiotičkog soja neophodno je da se naglasi doza i trajanje konzumacije za svaki soj posebno, na osnovu naučnih (eksperimentalnih i kliničkih) dokaza. Ukoliko to nije moguće utvrditi, potrebno je navesti minimalni vremenski period za koji bi soj trebalo da ispolji svoje dejstvo. Do tih informacija se dolazi nakon niza testova koja treba da uključe *in vitro*, kao i *in vivo* analize na životinjama i ljudima. *In vitro* testovi treba da ustanove potencijalne blagotvorne efekte na zdravlje, pre nego što se pristupi *in vivo* testovima. Eksperimenti (*in vitro* i/ili *in vivo*) koji su uključeni u odabir probiotika treba da objasne i mehanizme pozitivnog efekta probiotika. Danas je preporučeno nekoliko *in vitro* testova koji bi trebalo da se koriste u procesu analize probiotičkih svojstava nekog soja: tolerancija na kiselu sredinu i prisustvo žučnih soli, produkcija antimikrobnih supstanci i sposobnost adhezije za mukus i intestinalne ćelije čoveka (Havenaar and Huis

in't Veld, 1992; Collins et al., 1998). U Tabeli 1 su navedeni primeri *in vitro* adhezionih modela za GIT.

Tabela 1. Primeri *in vitro* adhezionih modela za GIT (modifikovano iz: van Tassel and Miller, 2011)

Model	Opis	Prednosti	Mane
Imobilisani mukus	Preparati imobilisanog mukusa, najčešće u mikrotitar pločama	Brza metoda, omogućava analizu interakcije mukus-mikroorganizam nezavisno od drugih <i>in vivo</i> uslova	Teško je odvojiti mukus-specifične od hidrofobnih interakcija
Kultura ćelija	Jednoslojni polarizovani epitel enterocita koji liči na intestinalno tkivo	Omogućava uslove više slične <i>in vivo</i> sredini.	Potiče od kancer ćelija, može da se razlikuje od zdravog tkiva. Ne predstavlja pravi odnos tipa ćelija u mukozalnim epitelijalnim tkivima
Caco-2/HT29	Caco-2 i HT29 ćelijske linije karcinoma	Jednostavan, dobro ustanovljen sistem u literaturi	Ne može se računati na prisustvo mukusa
HT29-MTX/FU	HT29 kultura tretirana sa metotreksatom ili fluoruracilom da bi sekretovale različit tip mukusa	Mukus je prisutan	Možda ne predstavlja adekvatnu ekspresiju <i>MUC</i> gena
Mešane kulture	Mešane kulture nesekretujućih i mukus-sekretujućih ćelija	Bolje predstavlja odnos tipa ćelija mukozalnog epitelijalnog tkiva	Malo literaturnih podataka u vezi sa analizom adhezije
Celo tkivo	Celo, intaktno tkivo ili isečak tkiva	Obezbeđuje <i>in vitro</i> uslove najbližnje <i>in vivo</i> sredini	Skupo i teško za izolovanje
Secirano tkivo	Fragmenti tkiva isečenog iz domaćina	Prisutni su: mukus, epitelijalno tkivo i komensalni mikroorganizmi	Samo mali fragmenti u određeno vreme mogu da se uzmu iz živog domaćina
Kultura organa	Celi organi se održavaju u <i>in vitro</i> uslovima	Bolje odražava arhitekturu tkiva	Skupo i moguće je da ne funkcioniše na isti način kao <i>in vivo</i>

Primeri mogućeg mehanizma delovanja probiotika su: produkcija antimikrobnih supstanci, kompetitivna ekskluzija vezivanja patogena, kompeticija za nutrijente i modulacija imunog sistema. Vrlo je bitna specifičnost delovanja mikroorganizma, tako da različiti probiotici imaju različit spektar pozitivnog delovanja. Aktivnost probiotika je

raznolika - od poboljšanja imunoloških, respiratornih i digestivnih funkcija kao i ublaživanja efekta infektivnih bolesti.

Da bi se smatrali bezbednim za korišćenje u ishrani ljudi, veoma je važno pokazati da probiotički sojevi ne poseduju gene odgovorne za rezistenciju na antibiotike i antimikrobne lekove (Salminen et al., 1998). Ukoliko se pokaže da neki soj poseduje gene za rezistenciju na antibiotike lociran na prenosivim genetičkim elementima, soj ne može da se koristi kao probiotik. Mada što se tiče bezbednosti korišćenja laktobacila, treba pomenuti da je do sada pokazano da sa povećanjem korišćenja probiotičkih laktobacila u humanoj medicini nije došlo do povećanja slučajeva bakteremija (Salminen et al., 2001).

Testovi *in vivo* se često vrše na laboratorijskim životinjama, ali sve te rezultate treba dodatno potvrditi analizama u humanim populacijama. Kada su u pitanju *in vivo* testovi na ljudima, neophodno je uraditi placebo kontrolisane studije sa dovoljnim brojem ispitanika da bi se obezbedila statistička značajnost (Andersson et al., 2001). Osim toga, poželjno je da se sva istraživanja rade u više nezavisnih centara istraživanja.

S obzirom da su probiotička svojstva vezana za bakterijski soj, neophodno je uraditi i tačnu identifikaciju i tipizaciju soja međunarodno priznatim genetičkim metodama (PFGE, DNK-DNK hibridizacija, sekvenciranje gena za 16S rRNK i sl.). Za već potvrđene probiotike neophodno je periodično uraditi ponovnu identifikaciju soja, proveriti vijabilnost kao i probiotička svojstva i aktivnost soja tokom pripreme proizvoda u kojem se unosi u ljudski organizam.

1.3. Primeri primene probiotika za poboljšanje stanja organizma kod zdravstvenih problema ljudi

Kad se analizira neki soj laktobacila kao probiotik, potrebno je prepoznati u slučaju kojih oboljenja bi se mogao potencijalno primeniti. Do sada su laktobacili i bifidobakterije bili u funkciji ispitivanja prevencije, poboljšanja simptoma ili lečenja različitih zdravstvenih problema:

- **Prevencija dijareje uzrokovane virusima ili patogenim bakterijama.** Infektivna dijareja je jedan od velikih zdravstvenih problema na svetskom nivou, pri čemu najviše

stradaju deca iz zemalja u razvoju, a do 30% dece iz razvijenih zemalja se svake godine suoči sa dijarejom poreklom od hrane. Što se tiče akutnih dijareja prouzrokovanih rotavirusima, dokazano je da *Lb. rhamnosus* GG i *Bifidobacterium lactis* BB-12 mogu da se koriste u prevenciji (Saavedra et al., 1994; Szajewska et al., 2001) i lečenju ove bolesti (Isolauri et al., 1991; Shornikova et al., 1997; Guandalini et al., 2000). Osim toga, dijareja može da se javi i usled povećanja broja *Clostridium difficile* i produkcije toksina od strane ove bakterije, kao posledica terapije atibioticima. U studijama Gorbach i saradnika (1987) i Biller i saradnika (1995) je utvrđeno da komercijalno korišćen probiotik *Lb. rhamnosus* GG omogućava restauraciju normalne mikroflore i tako ublažava simptome infekcije uzrokovane povećanjem broja *Cl. difficile*. Pored toga, *Lb. rhamnosus* GG je pokazao antagonističku aktivnost protiv *Salmonella enterica* ser. Typhimurium poznatog izazivača infekcija GIT (Hudault et al., 1997). I neki drugi sojevi su u *in vitro* testovima pokazali sposobnost inhibicije rasta i adhezije različitih enteropatogena. Tako npr. soj *Lb. acidophilus* LB inhibira adheziju enteropatogena (*S. enterica* ser. Typhimurium, enteropatogena *Escherichia coli* (EPEC), *Yersinia pseudotuberculosis* i *Listeria monocytogenes*) (Coconnier et al., 1993), a *Lb. rhamnosus* DR20 i *B. lactis* DR10 ispoljavaju antagonističku aktivnost prema EPEC (Gopal et al., 2001).

- **Aktivnost probiotika protiv infekcija izazvanih bakterijom *Helicobacter pylori* i inflamatornih crevnih bolesti.** *Helicobacter pylori* je Gram-negativni patogen koji je izazivač gastritisa tipa B i kancera želuca. Studije *in vitro* i *in vivo* sa životinjama su pokazale da BMK mogu da inhibiraju rast ovog patogena, kao i da smanje aktivnost enzima ureaze koji je neophodan patogenu da bi opstao u kiselim uslovima koji vladaju u želucu (Midolo et al., 1995; Kabir et al., 1997). Pokazani su pozitivni efekti *Lb. johnsonii* La1 (Michetti et al., 1999), *Lb. salivarius* (Aiba et al., 1998) i *Lb. acidophilus* LB (Coconnier et al., 1997) kod infekcija *H. pylori*. Probiotici mogu da dovedu do supresije infekcije *H. pylori* kao i do smanjenja rizika od ponavljanja infekcije (Michetti et al., 1999; Canducci et al., 2000; Felley et al., 2001). Takođe, Kronova bolest kao i iritabilni crevni sindrom mogu biti izazvane inflamacijom ili promenom u crevnoj flori (Shanahan, 2000). Probiotici (jedan soj ili kombinacija) mogu da imaju važnu ulogu u terapiji i sprečavanju bolesti (Gupta et al., 2000). Još uvek se istražuju svi tipovi interakcija između mikroorganizama i ćelija

domaćina, a da bi sa sigurnošću tvrdili da probiotik ispoljava pozitivne efekte potrebno je i do 10 godina da se proučavaju efekti probiotika na GIT molekularnim metodama.

- **Kancer.** Probiotički mikroorganizmi mogu da spreče ili odlože određene tipove kancera. Pokazano je da soj *Lb. casei* Shirota može da utiče na smanjenje kancera mokraćne bešike (Aso et al., 1995). *In vitro* analize sa sojevima *Lb. rhamnosus* GG i bifidobakterijama, *in vivo* testovi na *Lb. rhamnosus* GG i LC-705, kao i na *Propionibacterium* sp. su pokazali smanjenje prisutnosti kancerogenog aflatoksina u GIT-u (El-Nezami et al., 2000; Oatley et al., 2000). Treba napomenuti da dobijeni rezultati predstavljaju tek početak istraživanja i potrebno je izvršiti još mnogo dodatnih ispitivanja da bi se došlo do konačnog kliničkog zaključka u vezi sa efikasnošću probiotika u prevenciji kancera.

- **Alergije.** Kada su u pitanju alergije, praćen je efekat soja *Lb. rhamnosus* GG na modulaciju imunog odgovora i prevenciju pojavljivanja ranih alergija kod novorođenčadi. Zahvaljujući tome što su trudnice uzimale soj GG tokom trudnoće uočen je efekat smanjenja pojave alergija kod novorođenčadi (Kalliomaki et al., 2001). Osim toga, kod dece osetljive na kravlje mleko atopični dermatitis je smanjen konzumiranjem probiotičkih sojeva *Lb. rhamnosus* GG i *B. lactis* BB-12 (Majamaa and Isolauri, 1996, 1997; Isolauri et al., 2000).

- **Kardiovaskularne bolesti.** Postoje preliminarni dokazi da probiotički laktobacili mogu da doprinesu prevenciji i terapiji različitih sindroma ishemije srca kao i smanjenja holesterola u serumu (Oxman et al., 2001; de Roos and Katan, 2000).

- **Poremećaji urogenitalnog sistema.** Vaginalni ekosistem naseljava bogata mikroflora koja se sastoji od Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Boris et al., 1998). Laktobacili su dominantna populacija bakterija vagine, a pokazano je i da postoji veza između odsustva laktobacila u vagini, i učestalih pojava urogenitalnih infekcija. Kada su u pitanju vaginalni probiotici, poželjno je da imaju sposobnost kolonizacije vagine, redukovanja broja patogena kroz kompetitivnu ekskluziju ili adheziju kao i inhibiranje rasta patogena (Reid and Bruce, 2001). Tako, uzimanje sojeva laktobacila GR-1, B-54 i RC-14 u obliku kapsula dovodi do restauracije laktobacila u vaginalnoj sredini (Reid et al., 1995; Reid et al., 2001), što takođe može uticati na smanjenje broja patogenih bakterija u urinarnom traktu i tako sprečiti dalji zapaljenski proces.

1.4. Površinske karakteristike laktobacila

Gram-pozitivne bakterije imaju na svojoj površini ćelijski zid, koji se sastoji od debelog višeslojnog peptidoglikanskog (PG) sloja, teihoične kiseline, polisaharida, proteina, a kod nekih vrsta postoji i spoljni sloj proteina pakovanih u parakristalni S-sloj ("S-layer"). Teihoične kiseline (teichoic acids, TAs) mogu da budu kovalentno vezane za PG ("wall TAs" - WTAs) ili vezane za citoplazmatičnu membranu (lipoteihoične kiseline, LTAs) (Neuhaus and Baddiley, 2003). Svi laktobacili imaju TAs u svom zidu, ali su WTAs specifične samo za neke predstavnike ovog roda. Mnogi predstavnici vrsta *Lb. rhamnosus* i *Lb. casei* imaju samo LTA (Perea Vélez et al., 2007), dok mnogi sojevi vrste *Lb. plantarum* imaju oba pomenuta tipa TAs (Palumbo et al., 2006). Pomenute molekularne strukture obezbeđuju svojstva uglavnom specifična za vrstu, ili soj u okviru vrste bakterija (Delcour et al., 1999). Ćelijski zid bakterija predstavlja svojevrsni egzoskelet koji štiti od osmotskog ili mehaničkog stresa, ali pruža i fiziološku potporu mnogim molekulima kao što su površinski proteini. Neki od ovih proteina imaju bitnu funkciju interakcije sa spoljašnjom sredinom (Sánchez et al., 2008).

1.4.1. Površinski proteini

Površinski proteini mogu da budu odgovorni za neke probiotičke karakteristike. Zato je njihova karakterizacija i identifikacija bitna za bolje razumevanje interakcije probiotičkih bakterija sa GIT sredinom. Proteini na površini bakterija mogu da se sekretuju u spoljašnju sredinu, ili zahvaljujući specifičnim domenima da ostanu vezani za ćelijski zid ili citoplazmatičnu membranu bilo kovalentnim ili nekovalentnim interakcijama. Drugi proteini koji nemaju specifične domene, a u vezi su sa bakterijskom površinom ili se oslobađaju u ekstraćelijsku sredinu, zovu se neukotvljeni ("anchorless") multifunkcionalni proteini (ili "moonlight" proteini) (Sánchez et al., 2008).

Laktobacili poseduju različite proteine vezane za ćelijski zid, koji su često veliki i imaju ponovljene module određenih domena. Uopšteno gledano, proteini koji se eksportuju imaju signalni (lider) peptid koji im pomaže u migraciji do ćelijske površine. Lider peptid se sastoji od 15 do 20 hidrofobnih ostataka, a na N-terminusu sadrži pozitivne naelektrisane

ostatke. Proteinima koji se sekretuju, signalna (lider) peptidaza uklanja lider peptid nakon translokacije kroz membranu. Neki proteini poseduju jedan ili više dodatnih domena koji im omogućavaju ukotvljavanje u ćelijski zid ili za citoplazmatičnu membranu što sprečava njihovu sekreciju u spoljašnju sredinu.

Što se tiče proteina vezanih za ćelijsku površinu, razlikuju se kovalentno vezani (proteini sa LPXTG motivom i lipoproteini) i nekovalentno vezani. Najpoznatija je grupa sortaza-zavisnih površinskih proteina koji na svom C- terminusu imaju LPXTG motiv koji prepoznaje enzim sortaza koja seče između treonina i glicina i kovalentno vezuje karboksilnu grupu treonina za amino grupu prekursora peptidoglikana. Nakon ove reakcije protein ostaje kovalentno vezan za PG i ispoljava svoju funkciju na spoljašnjoj površini bakterije (Marraffini et al., 2006). Drugi tip kovalentno vezanih proteina za ćelijski zid su lipoproteini koji imaju N-terminalnu "lipobox" motiv sekvencu (LXXC) koja im omogućava vezivanje za lipide citoplazmatične membrane (Sutcliffe and Harrington, 2002). Ovi lipoproteini imaju funkciju da prihvate specifične supstrate kao što su ugljeni hidrati i da ih dopreme dalje u transportnu mašineriju u citoplazmatičnoj membrani (Navarre and Schneewind, 1999). Proteini koji su nekovalentno vezani za ćelijsku površinu poseduju N-ili C-terminalne transmembranske delove. Ti delovi se sastoje od hidrofobnih aminokiselina (koje su praćene pozitivno naelektrisanim ostacima) koje omogućavaju ukotvljavanje u membranu bakterije (Bath et al., 2005). Opisani su i proteini koji sadrže LysM tip ponovaka, tako kod *Lactococcus lactis* ovaj tip ponovaka može biti odgovoran za vezivanje autolizina AcmA (Steen et al., 2003). Kod *Lb. plantarum* prisustvo WXL motiva na C-terminusu je jedan od tipova mogućih domena za vezivanje za bakterijsku površinu (Kleerebezem et al., 2003).

Pomenuti proteini S-sloja formiraju parakristalni heksagonalni ili tetragonalni sloj koji često pokriva ceo ćelijski zid. To su mali i visoko bazni proteini od 40 do 60 kDa, nekovalentno vezani za ćelijski zid (najčešće za LTA, WTA ili neutralne polisaharide) i čine 10-15% od ukupnih površinskih proteina (Avall-Jaaskelainen and Palva, 2005).

Za bakterijske proteine koji se sekretuju u spoljašnju sredinu poznata su dva tipa sekrecionih sistema: takozvani ATP-zavisni generalni sekretorni put (GSP) i specifični proteinski put za eksport. GSP je energetski zavisan i koriste ga proteini koji se sintetišu kao preproteini sa signalnim peptidom na N-terminusu (Ala-X-Ala motiv ili lipoprotein

signalni peptid Leu-Ala-Gly-Cys). Preproteini se translociraju kroz hidrofilne kanale nakon čega se proteolitički uklanja signalni peptid. Specifični sistemi za eksport proteina su npr. Tat put koji karakteriše prisustvo dva uzastopna Arg u signalnom peptidu i koriste se ABC ili AC sistemi za transport. Proteini koji nemaju signalne peptide se direktno sekretuju specifičnim ABC transporterima (Sánchez et al., 2008).

1.4.2. Faktori adhezije laktobacila za GIT čoveka

Intestinalne epitelijalne ćelije predstavljaju barijeru koja ima ključnu ulogu u interakciji domaćina sa sadržajem creva. Iako je do sada objavljen veliki broj *in vitro* studija koje su pokazale adheziju laktobacila za površinu epitela, samo je u nekoliko *in vivo/ex vivo* studija potvrđena sposobnost adhezije laktobacila za površinu intestinalnog epitela (Valeur et al., 2004). Adhezini laktobacila mogu da se klasifikuju prema: ciljevima za koje se vezuju (komponente mukusa, ekstracelularni matriks), lokalizaciji na površini bakterija (površinski proteini) ili na osnovu načina kako su vezani za bakterijsku površinu.

U poslednje vreme su okarakterisani proteini koji se vezuju za mukus, tzv. “mucus-binding“ proteini (Mub). Ovi proteini su sa prepoznatljivim LPXTG motivom koji im omogućava sortaza-zavisno vezivanje za PG, više MucBP domena za vezivanje za mukus i na N- terminusu imaju signalni protein za sekreciju. Pokazano je da je vezivanje Mub proteina za mukus kompetitivno inhibirano glikoproteinom fetuinom, azialofetuinom i fukozom, što bi značilo da Mub interaguju sa specifičnim muko-oligosaharidima (Kleerebezem et al., 2010). Primeri za Mub proteine su kod *Lb. acidophilus* NCFM, koji ima Mub i FbpA (protein koji se vezuje za fibronektin), od kojih Mub ima 17 MucBP domena (Buck et al., 2005) i *Lb. reuteri* 1063 koji ima Mub protein sa 14 MucBP domena (Roos and Jonsson, 2002). Kod *Lb. salivarius* UCC118 LspA protein učestvuje u adheziji ovog soja za epitelijalne ćelije i mukus (Claesson et al., 2006; van Pijkeren et al., 2006).

Vezivanje za komponente ekstracelularnog matriksa (ECM) koga čine kolagen i laminin, je opisano za CbsA protein S-sloja soja *Lb. crispatus* JCM 5810 (Toba et al., 1995; Sillanpaa et al., 2000). CbsA protein svojim N- terminusom interaguje sa komponentama ECM, a C- terminusom je vezan za negativno naelektrisane komponente ćelijskog zida

bakterije (Antikainen et al., 2002). Tako se ponaša i N- terminus SlpA proteina soja *Lb. brevis* ATCC 8287 koji omogućava vezivanje za kolagen, fibronektin i humane epitelijalne ćelije (Vidgren et al., 1992; Hynonen et al., 2002). Za humane epitelijalne ćelije se vezuju još Slp protein soja *Lb. helveticus* R0052 (Johnson-Henry et al., 2007) i SlpA protein soja *Lb. acidophilus* NCFM (Buck et al., 2005). Postoje i drugi proteini koji nisu deo S-sloja, a omogućavaju vezivanje za ECM, kao što je na primer kolagen-vezujući protein (CnBP) soja *Lb. reuteri* NCIB 11951 (Aleljung et al., 1994). Interesantno je da su kod *Lb. johnsonii* La1 NCC 533 pronađena dva proteina koja se normalno nalaze u citoplazmi, ali ukoliko se nađu na površini ćelije učestvuju u adheziji za GIT i mukus: elongacioni faktor EF-Tu i protein toplotnog stresa GroEL (Granato et al., 2004; Bergonzelli et al., 2006).

Posebno su interesantne strukture pila koje su u laktobacilima vizualizovane i opisane po prvi put u vrsti *Lb. rhamnosus* GG (Kankainen et al., 2009). Fimbrije ili pili su tanke proteinske ekstenzije sa bakterijskih ćelija, prvenstveno kod Gram-negativnih bakterija, a kod patogena predstavljaju virulentne faktore koji promovišu adheziju za domaćina (Connell et al., 1996). Analizom uloge pila soja *Lb. rhamnosus* GG, pokazano je da je subjedinica pila SpaC, koja se nalazi u okviru strukture i na vrhu pila, bitna za interakciju *Lb. rhamnosus* GG sa mukusom domaćina (Kankainen et al., 2009).

Adhezija za epitel GIT može da se ostvari i uz pomoć molekula koji nisu proteinske prirode. Tako LTA kod *Lb. johnsonii* NCC 533 učestvuje u adheziji za Caco-2 ćelije i za mucin (Granato et al., 1999). Kod soja *Lb. reuteri* 100-23 LTA omogućava kolonizaciju mišijeg GIT-a (Walter et al., 2007). Pokazano je da i egzopolisaharidi (EPS) koje proizvode bakterije imaju funkciju adhezije za ECM komponente. Interesantno je istraživanje Ruas-Madiedo i saradnika iz 2006. godine gde je primećeno kompetitivno uklanjanje probiotika, a povećano vezivanje patogena u prisustvu EPS molekula dve bifidobakterije (*B. longum* NB667 i *B. animalis* IPLA-R1) dok EPS soja *Lb. rhamnosus* GG nije pokazao pomenute efekte.

1.4.3. Sposobnost agregacije kod laktobacila

Agregacija se može definisati kao grupisanje bakterijskih ćelija u tečnoj kulturi i ukoliko su u pitanju ćelije istog soja to se naziva autoagregacija, a kada su u pitanju ćelije različitih vrsta bakterija zove se koagregacija (Ocaña et al., 2002; Schachtsiek et al., 2004).

Formiranje agregata laktobacila je bitno za kolonizaciju usne duplje (Kolenbrander, 2000), creva (Jankovic et al., 2003) ili urogenitalnog trakta (Reid et al, 1990). Agregacija se može smatrati selektivnim kriterijumom pri biranju probiotika, jer probiotici koagregirajući sa intestinalnim patogenima mogu da dovedu do njihovog uklanjanja iz gastrointestinalnog trakta (Schachtsiek et al., 2004). Zahvaljujući sposobnosti agregacije, soj *Lb. crispatus* M247 bolje preživljava u debelom crevu od svog mutanta MU5 koji je izgubio tu sposobnost (Voltan et al., 2007). Takođe, *Lb. crispatus*, koji agregira, bolje se vezuje za Caco-2 ćelijsku liniju nego njegov derivat koji ne agregira (Cesena et al., 2001). Do sada je opisano nekoliko proteina koji su zaslužni za agregaciju: Cpf protein (19,9 kDa) soja *Lb. coryniformis* DSM 20001 (Schachtsiek et al., 2004), MUB protein (353 kDa) soja *Lb. reuteri* ATCC 53608 (ili 1063) koji ima ulogu vezivanja za mukus, ali i učestvuje u autoagregaciji (MacKenzie et al., 2010), a ranije je pokazano da i AggH protein (56 kDa) istog soja učestvuje u autoagregaciji (Roos et al., 1999). Interesantan je podatak da u agregaciji i formiranju biofilma soja *Lb. reuteri* TMW1.106 učestvuju egzopolisaharidi, a soj *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 koji proizvodi egzopolisaharide u velikoj količini, ispoljava autoagregaciju i hidrofobne karakteristike ćelija (Walter et al., 2008; Aslim et al., 2007).

1.4.4. Egzopolisaharidi laktobacila

Sposobnost biosinteze polisaharida je široko rasprostranjena među bakterijama. Mikroorganizmi mogu da sintetišu polisaharide koji služe za skladištenje (glikogen u citoplazmi) i strukturne polisaharide (peptidoglikan i LTAs kod Gram-pozitivnih i lipopolisaharidi (LPS) kod Gram-negativnih bakterija). Neke bakterije sintetišu kapsularne polisaharide (CPS) koji čine kapsulu, tj. čvršći sloj polisaharida kovalentno vezan za ćelijsku površinu, kao i egzopolisaharide (EPS) koji formiraju sloj slabije vezan za ćelijsku površinu ili se sekretuju u okolinu (Madigan et al., 1997).

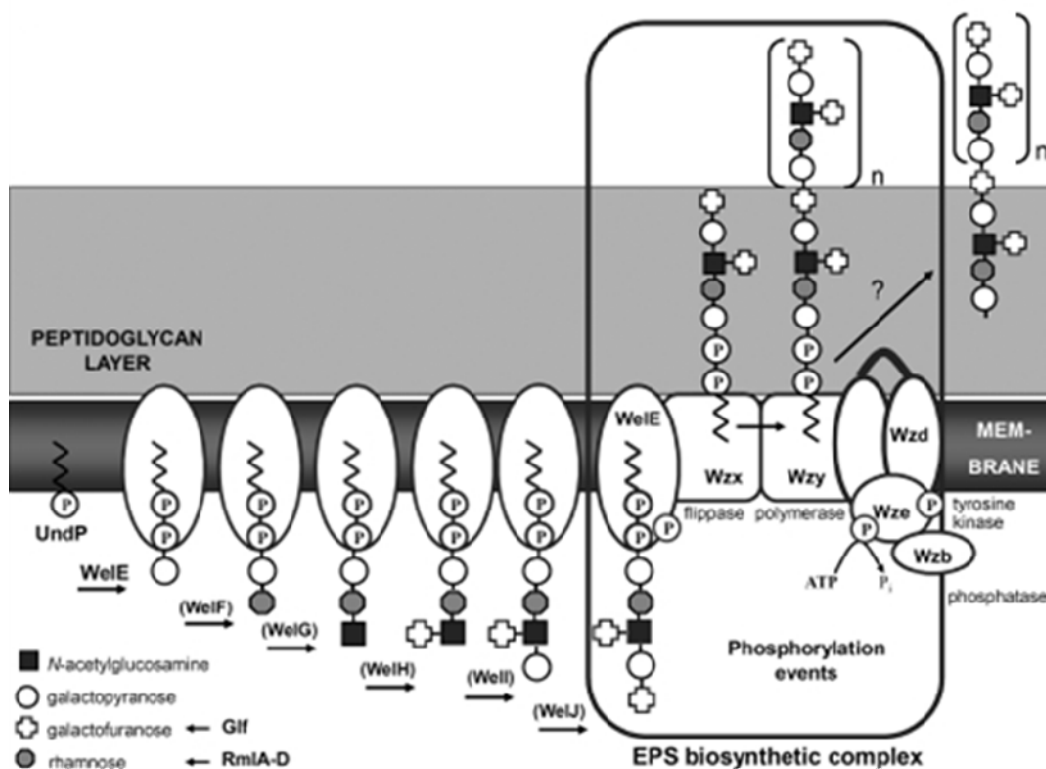
Na osnovu hemijskog sastava EPS se deli na homopolisaharide (HoPS) koji sadrže samo jedan tip monosaharida i heteropolisaharide (HePS) koji poseduju ponavljajuće jedinice koje čine dva ili više tipova monosaharida (de Vuyst and Degeest, 1999). Na osnovu svoje strukture HoPS kod BMK se dele u četiri grupe: α -D-glukani (dekstrani,

mutani, alternani i reuterani), β -D-glukani, β -D-fruktani (levani i fruktani inulinskog tipa) i poligalaktani (Ruas-Madiedo et al., 2002; Walling et al., 2005; van Hijum et al., 2006). HoPS su često velike molekule mase (do 10^7 Da), različitog stepena i tipa grananja i dužine lanaca (van Hijum et al., 2006). HePS su sastavljeni od ponavljajućih jedinica koje mogu biti granate ili ngranate koje sadrže od tri do osam monosaharida, derivata monosaharida ili supstituisanih monosaharida. HePS najčešće sadrže D-glukozu, D-galaktozu i L-ramnozu. U sastavu HePS-a mogu biti i fukoza, riboza, N-acetilglukozamin i N-acetilgalaktozamin, kao i fosfat, acetat i glicerol (de Vuyst and Degeest, 1999; de Vuyst et al., 2001). BMK, kako mezofilne, tako i termofilne (pripadnici rodova *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*) sintetišu HePS koji može da se razlikuje po sastavu, strukturi, molekulskoj masi i funkciji, što može biti svojstvo vezano za pojedinačni soj. Veličina HePS-a može da bude od 4×10^4 do 6×10^6 Da. HePS može da ispoljava "ropy" karakter tj. ima osobinu da se razvlači ili tegli što je u vezi sa njegovom velikom molekulskom masom (de Vuyst and Degeest, 1999; Mozzi et al., 2006). Do sada je okarakterisano preko 50 struktura HePS koje sintetišu BMK koristeći nuklearno magnetnu rezonantnu spektroskopiju (NMR) i od njih 31 HePS poseduje jedinstvenu strukturu. HePS mogu da variraju i u naelektrisanju, prostornom rasporedu i stepenu krutosti, kao i sposobnosti interakcije sa proteinima kao posledicom njihovog različitog sastava i molekulske mase (Duboc and Mollet, 2001).

- **Biosinteza heteropolisaharida kod bakterija mlečne kiseline.** Početak sinteze HePS počinje od formiranja ponavljajućih jedinica intracelularno. U sintezi HePS-a učestvuje nekoliko enzima: glikozil-1-fosfat transferaza (primarna glikoziltransferaza) koja vrši prenos prvog monomera (npr. UDP-glukozu) na fosforilisani lipidni nosač, jedna ili više glikoziltransferaza (GT) koje sekvencijalno dodaju nove monomere na rastuću ponavljajuću jedinicu, dodatni regulatorni proteini koji učestvuju u regulaciji *eps* gena, proteini koji vrše membransku translokaciju ponavljajućih jedinica i polimerizaciju/kontrolu dužine lanca (Broadbent et al., 2003). Dodatni enzimi iz centralnog metabolizma ugljenih hidrata obezbeđuju npr. glukozo-1-fosfat kao ključni metabolit za početak sinteze EPS-a (Ramos et al., 2001). Velika strukturalna raznovrsnost EPS molekula je posledica bogatstva specifičnih GT koje formiraju glikozidne veze između donorskih i akceptorskih molekula (Stingele et al., 1999).

- **Lokacija i organizacija gena uključenih u biosintezu heteropolisaharida BMK.**

Genetičke determinante HePS mogu biti locirane na hromozomalnoj ili plazmidnoj DNK. Geni uključeni u biosintezu HePS (*eps* geni) su organizovani u klastere koji su visoko konzervisani po sekvenci i organizaciji (Boels et al., 2001). Na Slici 1. je prikazana shema biosinteze EPS-a *Lb. rhamnosus* GG. Prvo se fosfogalaktozilni ostatak prenosi sa aktiviranog monomera na undekaprenol fosfat lipidni nosač na citoplazmatskoj membrani ćelije, što je aktivnost primarne GT koja je vezana za membranu (W_eI_E). Zatim jedinstvene GT W_eI_F do W_eI_J nastavljaju da dodaju preostale monomere, koristeći one koji su dostupni u citoplazmi (npr UDP-galaktoza) ili koje sintetišu specifični enzimi iz EPS genskog klastera (UDP-galaktofuranosa kodirana *glf* genom). Kada se sintetiše EPS jedinica, W_x flipaza vrši translokaciju kroz citoplazmatsku membranu, a W_z polimeraza povezuje ponavljajuće jedinice EPS-a i tako se formira dugački lanac EPS-a. U regulaciju biosinteze EPS su uključeni autofosforilišuća tirozin kinaza (W_zE) i fosfotirozin protein fosfataza (W_zB) (Lebeer et al., 2009).



Slika 1. Predložena shema biosinteze EPS-a kod *Lb. rhamnosus* GG. (Preuzeto iz: Lebeer et al., 2009)

Prvi okarakterisani EPS operon BMK je iz soja *St. thermophilus* Sfi6 čiji EPS genski klaster je veličine 14,5 kb i sastoji se od 13 gena organizovanih u jedan operon sa svim funkcionalnim jedinicama za sintezu HePS (Stingele et al., 1996). Kod drugog soja *St. thermophilus* NCBF 2393, deo kloniranog EPS operona je pokazivao skoro 100% identičnost sa EPS operonom soja *St. thermophilus* Sfi6 (Griffin et al., 1996) dok je kod soja *St. thermophilus* MR-1C pokazivao visoku homologiju sa EPS operonom soja *St. thermophilus* Sfi6 (Low et al., 1998). Kod pomenutih termofilnih BMK produkcija EPS-a je kodirana sa hromozomalne DNK. Kod laktokoka su takođe okarakterisani EPS operoni, uglavnom na plazmidnoj DNK kao kod *Lc. lactis* NIZO B40, gde je na 42810 kb plazmidu lociran EPS operon veličine 12 kb koji se sastoji od 14 gena koji je i funkcionalno okarakterisan. Isti autori su potvrdili da i kod drugih testiranih 16 *Lc. lactis* sojeva plazmidna DNK nosi informaciju za sintezu EPS-a (van Kranenburg et al., 1999). Interesantno je da je kod *Lc. lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461 utvrđena hromozomska lokalizacija regiona veličine 13,2 kb koji se sastoji od 15 gena koji kodiraju EPS sintezu, a operon je i funkcionalno okarakterisan inaktivacijom primarne glikoziltransferaze što dovodi do gubitka produkcije EPS-a (Dabour and LaPointe, 2005). Kod laktobacila su do sada okarakterisani EPS operoni locirani na hromozomu, osim kod *Lb. casei* subsp. *casei* NCIB 4114 kod koga se čišćenjem plazmida gubi Muc⁺ fenotip (Vescovo et al., 1989). Poslednjih godina je u fokusu istraživanje strukture, sastava kao i biološke uloge EPS-a kod laktobacila, ali je kod sojeva *Lb. rhamnosus* najviše rađeno na funkcionalnoj karakterizaciji gena uključenih u produkciju EPS-a. Na primer, četiri soja *Lb. rhamnosus* poseduju u hromozomu region veličine 18,5 kb koji se sastoji od 17 gena koji kodiraju enzime za EPS biosintezu, koji pokazuju visoku međusobnu homologiju. Uprkos visokoj homologiji gena i organizaciji gena u okviru klastera, produkcija EPS-a kod ovih sojeva varira od oko 100 mg/l kod *Lb. rhamnosus* ATCC9595 do čak 2350 mg/l u soju *Lb. rhamnosus* RW-9595M što je ujedno i do sada najviša opisana produkcija HeEPS-a kod BMK (Péant et al., 2005). Probiotički soj *Lb. rhamnosus* GG poseduje EPS operon koji je takođe okarakterisan i pokazuje homologiju sa EPS operonom soja *Lb. rhamnosus* ATCC9595, ali ima i originalnu strukturu *eps* gena u okviru operona (Lebeer et al., 2009). *Lb. helveticus* u svom hromozomu ima EPS operon veličine 14 kb koji se sastoji od 11 ORF-a za biosintezu EPS-

a, dok je kod *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lfi5 u regionu veličine 18 kb u hromozomu prisutno 14 gena koji kodiraju sintezu EPS-a (Jolly et al., 2002; Lamothe et al., 2002).

- **Funkcija i uloga EPS-a.** HePS se sintetišu u manjoj količini od HoPS-a. HePS-ovi se sintetišu u količinama od 25 do 600 mg/l, dok HoPS može da se sintetiše i do 10 g/l, što je uočeno kod *Lb. reuteri* LB 121 (van Geel-Schutten et al., 1999). Osnovni faktori koji utiču na sintezu HePS-a su temperatura, period fermentacije, pH i sastav medijuma (izvor ugljenika i azota), nivo rastvorenog kiseonika, prisustvo citrata, mangana, kalcijuma i purinskih i pirimidinskih baza (npr. adenina) (Torino et al., 2005). Ukoliko se bakterije gaje na nižoj temperaturi od optimalne, tada je produkcija EPS-a povećana. Ova karakteristika bakterija da pokazuju povećanu sintezu polisaharida na nižoj temperaturi je već duže vreme poznata, još je Sutherland 1972. godine predložio mehanizam koji objašnjava da je na nižoj temperaturi rast bakterija sporiji, pa postoji više izoprenoidnih glikozil-lipidnih nosača koji se ne koriste za sintezu ćelijskog zida, već su na raspolaganju za biosintezu EPS-a (Sutherland, 1972). Još uvek nije jasno definisana fiziološka uloga EPS-a, ali s obzirom da se koristi velika količina energije za njegovu sintezu, EPS bi trebalo da poveća adaptivnu (ekološku) prednost soju koji ga proizvodi. EPS-ovi mogu da spreče citotoksični efekat toksina drugih bakterija na eukariotske ćelije domaćina. Tako je pokazano za EPS soja *Lb. rhamnosus* GG i EPS više vrsta bifidobakterija koji je uspešno delovao protiv citotoksičnog efekta toksina *Bacillus cereus* na eritrocite i Caco-2 ćelije (Ruas-Madiedo et al., 2010): EPS ima bitnu ulogu u intestinalnoj kolonizaciji, što je pokazano za *Lb. rhamnosus* GG, gde izogeni mutant CMPG5351 koji ne produkuje veliki EPS bogat galaktozom, pokazuje smanjeno održanje u mišijem GIT-u u odnosu na parentalni *Lb. rhamnosus* GG kod koga produkcija EPS-a nije narušena (Lebeer et al., 2011). Pored uloge u kolonizaciji, EPS može da interferira sa adhezijom patogena i probiotika za intestinalni mukus (Ruas-Madiedo et al., 2006). Neki EPS molekuli pokreću imuni odgovor u različitim ćelijama i tkivima. Na primer, *Lb. rhamnosus* ATCC9595 i njegova izogena varijanta *Lb. rhamnosus* RW-9595M koji značajno više produkuje EPS-a, su testirani na produkciju nivoa različitih citokina i uočeno je da je parentalni soj indukovao smanjenje inflamatornih citokina u odnosu na RW-9595M (Bleau et al., 2010). Pored pomenutih osobina, detektovano je da EPS soja *Lb. feriranofaciens* WT-2B(T) može da smanji ukupni holesterol i trigliceride u serumu i jetri pacova (Maeda et al., 2004). EPS molekuli mogu da služe i kao prebiotici, koji se definišu

kao jedinjenja, koja selektivno stimulišu rast i/ili aktivnost bakterija koje su stanovnici GIT-a. Poznati prebiotici su inulin (sastoji se od fruktoze), fruktooligosaharidi, galaktooligosaharidi i glukooligosaharidi (β -glukani). Nakon bakterijske digestije ovih molekula, ostaju masne kiseline kratkog lanca koje regulišu metabolizam masti i ugljenih hidrata domaćina i malo snižavaju intestinalni pH što može da dovede do ekskluzije patogena (Ruas-Madiedo et al., 2008). Hemijski sastav nekih od EPS molekula je sličan prebioticima, tako da bi možda neki probiotici i komensalni mikroorganizmi mogli da ih metabolišu, ali se ova uloga EPS-a još istražuje. Što se tiče tehnoloških primena EPS-a, bitno je reći da svojim prisustvom EPS polimeri menjaju viskozitet i teksturu finalnog proizvoda (npr. sira ili jogurta). Hemijski sastav, dužina lanca, molekulska masa i radijus okretanja doprinose specifičnim fizičkim osobinama EPS-a kao što su rastvorljivost i viskozitet (Laws and Marchall, 2001). EPS povećava zadržavanje vlažnosti, tako da se BMK producenti EPS-a često koriste za proizvodnju sireva sa malim procentom masti, gde poboljšavaju teksturu i skraćuju vreme zrenja npr. kod "Mozzarella" i "Cheddar" sira (Ruas-Madiedo et al., 2008).

1.5. Imuni sistem čoveka - citokini

Imuni sistem predstavlja skup organa, tkiva, ćelija i njihovih produkata koji učestvuju u imunom odgovoru. Imunitet može biti urođeni ili stečeni (adaptivni). Komponente urođenog imuniteta su: epitelne barijere i solubilni produkti epitela, sa kojima se mikroorganizmi prvi susreću; zatim fagociti i prirodne ćelije ubice (NK ćelije) i njihovi produkti-citokini; proteini plazme (sistem komplementa). Urođeni imunitet prepoznaje i reaguje na mikroorganizme, a u prepoznavanju se koriste isti mehanizmi za različite vrste mikroorganizama. Pored toga, urođeni imunitet pospešuje delovanje stečenog imuniteta. Komponente stečenog imuniteta su limfociti i njihovi produkti: B i T limfociti i imunoglobulini (Bauman, 2004). Stečeni imunitet prepoznaje mikrobne i nemikrobne molekule koji se zajedničkim imenom nazivaju antigeni, a prepoznavanje antigena je specifično (zahvaljujući receptorima na limfocitima). B limfociti kao nosioci humoralnog imuniteta su više zaduženi za ekstraćelijske patogene i sintetišu antitela, a T limfociti, pogotovu T citotoksične ćelije indukuju smrt ćelija nosioca intraćelijskih patogena i

maligno transformisanih ćelija. Za razliku od citotoksičnih T ćelija, regulatorne T ćelije (Treg) su poznate kao supresorne T ćelije, jer suprimiraju odgovor drugih imuno ćelija, održavaju toleranciju na antigene samog organizma i sprečavaju autoimune bolesti (Moon et al., 2009). Određen tip T limfocita su Th ("T helper") ćelije koje nemaju citotoksičnu ni fagocitirajuću funkciju, već aktiviraju i diriguju rad drugih imunih ćelija putem citokina, tako da su esencijalne za aktivaciju B limfocita i sintezu antitela, u aktivaciji i rastu citotoksičnih T ćelija, kao i makrofaga (Harrington et al., 2005).

Citokini su regulatorni proteini koji su medijatori međućelijskih reakcija u fiziološkim i patološkim procesima. Citokini predstavljaju solubilne produkte raznovrsnih ćelija (bubrega, kože i ćelija imunog sistema), koji su neophodni u reakcijama kako specifične tako i nespecifične imunosti. Imuni odgovor ne može da se odvija bez citokina jer su oni signalni molekuli između različitih leukocita. Pored toga što isti citokini mogu da budu produkti različitih ćelija, jedan citokin može da deluje na više vrsta ćelija (pleotropizam), više citokina može da ispoljava istu funkciju, mogu da deluju sinergistički, ali i antagonistički sa drugim citokinima. Citokini su sledeće supstance:

- **Interleukini (IL)** - signalni molekuli između leukocita;
- **Interferoni (IFN)** - citokini koji su i antiviralni proteini;
- **Faktori rasta** - stimulišu deobu stem ćelija tako da organizam ima dovoljno svih tipova leukocita;
- **Faktori nekroze tumora (TNF)** - makrofazi i T ćelije sekretuju TNF-ove da bi uništili ćelije tumora i regulisali imuno odgovor i inflamaciju;
- **Hemokini** - signalizuju leukocitima da idu ka mestu inflamacije ili infekcije i da aktiviraju ostale leukocite (Bauman, 2004).

Citokini mogu da se dele na medijatore nespecifične imunosti (npr. TNF- α , IL-1, IL-6, hemokini) i na medijatore specifične imunosti (npr. IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α). Ako su u pitanju medijatori nespecifične imunosti, njihova funkcija je zaštita od virusnih infekcija i indukcija zapaljenja. Interesantno je da IL-6 koga sintetišu T i B limfociti i makrofazi može da reaguje kao proinflamatorni (medijator je groznice), i kao antiinflamatorni kada može da inhibira TNF- α i IL-1 (Banks et al., 1994). Primer hemokina je IL-8 koga produkuju makrofazi, epitelijalne i endotelijalne ćelije (koje ga skladište u vezikule) (Wolff et al., 1998). Primarna funkcija IL-8 je da regrutuje neutrofile koji vrše fagocitozu (Köhidaï and

Csaba, 1998). Što se tiče medijatora specifične imunosti, IFN- γ je uglavnom zadužen za Th1 ćelijski odgovor, dok je IL-4 (antiinflamatorni citokin) zadužen za Th2 ćelijski odgovor tj. humoralni tip imunog odgovora.

Ukoliko je u pitanju humoralni odgovor, ćelije koje fagocitiraju bakterije mogu da aktiviraju T limfocite, ali ćelije koje su specijalizovane da prezentuju antigene T limfocitima su dendritičke ćelije. Uz pomoć citokina (IL-1, koji može biti u formi IL-1 α i IL-1 β) antigen prezentujuće ćelije (APĆ) daju signal T ćelijama da se diferenciraju u Th2 ćelije (March et al., 1985). Ove ćelije su uključene u odbranu od ekstracelularnih parazita. Th2 ćelije sekretuju IL-4 koji aktivira B ćelije koje brzo proliferišu u memorijske B ćelije i u plazma ćelije koje dalje sekretuju antitela. Th2 luče i IL-10 (antiinflamatorni citokin) koji inhibira makrofage i uopšte Th1- tip ćelijskog odgovora (Bauman, 2004).

Ukoliko je u pitanju ćelijski odgovor, to je više odgovor na prisustvo intraćelijskih patogena i virusa. APĆ sekretuju IL-12 koji stimuliše Th ćelije da se diferenciraju u Th1 ćelije. Ove ćelije stimulišu fagocitozu i uništavanje patogena makrofazima i drugim limfocitima. Th1 ćelije sekretuju IL-2 i IFN- γ koji aktivira citotoksične T ćelije koje proliferišu u memorijske T ćelije i ćelije koje ubijaju zaražene ćelije. IFN- γ pored direktne aktivacije makrofaga ima ulogu u diferencijaciji B limfocita u B efektorske ćelije. Th1 ćelije luče i TNF α koji je inflamatorni citokin. Poremećaji u funkciji TNF α mogu dovesti do oboljenja kao što je Alchajmerova bolest, bolest zapaljenja creva ("inflammatory bowel disease") ili duboke depresije (Swardfager et al., 2010; Brynskov et al., 2002; Dowlati et al., 2010).

Postoje i Th17 ćelije koje su uključene u inflamaciju i odbranu domaćina od ekstracelularnih patogena. Za diferencijaciju T naivnih ćelija u Th17 je neophodan IL-6 i TGF- β , a relativni balans ova dva citokina može da utiče na diferencijaciju bilo Treg ili Th17 ćelija. Citokin IL-23 indukuje lučenje familije IL-17 citokina, koji dalje dovode do indukcije npr. i IL-6 i IL-1 β (Kuby et al., 2007). Za IL-17A i IL-17F se smatra da mogu da utiču na razvoj kolitisa (Leppkes et al., 2009). IL-17F može da ima i proinflamatornu ulogu u astmi, ali sa druge strane, pokazano je da varijanta gena za IL-17F funkcioniše kao antagonist divljeg tipa gena, te može da ima bitnu ulogu kod terapije astme (Kawaguchi et al., 2009).

1.6. Uticaj laktobacila na imuni sistem čovekovog GIT-a

Primarna funkcija imunog sistema je eliminacija pretnje koju mikroorganizmi predstavljaju po domaćina. U simbiotski odnos sa domaćinom su uključeni i patogeni i mutualistički mikrobi. Uticaj mikroorganizama na imunitet domaćina je vrlo kompleksan što je i rezultat koevolucije radi preživljavanja pod konstantnim pritiskom prirodne selekcije. Nakon ulaska u GIT, mikroorganizmi se suočavaju sa mukusnom barijerom, koja može dinamično da odgovori na infekciju i regulisana je kako urođenim tako i adaptivnim imunitetom. Mukus produkuju specijalizovane sekretorne ćelije koje su prisutne u celom GIT-u. Sekretorne ćelije luče pljuvačku u ustima, koja pored mucin- glikoproteina ima i antimikrobne molekule: nespecifične (različiti defenzini i lizozim) i specifične imunoglobuline (IgG, IgM, sekretorni IgA tj. sIgA). Od želuca do rektuma mukoza se sastoji od jednog sloja epitelijalnih ćelija koje su pokrivene slojem sekretovanog mukusa koji je najdeblji u želucu i u debelom crevu. Ovaj sloj je velika barijera koja odvaja epitelijalne ćelije od mikroorganizama. Mukus, kao i pljuvačka, je kompleksan i sastoji se od mucin-glikoproteina (oko 20 različitih, koji se specifično luče u određenim delovima GIT-a) koji obezbeđuju viskoznost, kao i od raznovrsnih antimikrobnih molekula, nespecifičnih (različiti defenzini, lizozim, lektini, kolektini i histatini) i već pomenutih specifičnih sekretornih imunoglobulina. Razlikuje se spoljašnji sloj mukusa koji je u kontaktu sa mikroorganizmima (u debelom crevu je to najdeblji sloj) i praktično sterilni sloj mukusa koji je uz epitelijalne ćelije. U želucu i debelom crevu mukus produkuju peharaste (“goblet”) ćelije, a u tankom crevu to čine peharaste i Panetove ćelije (McGuckin et al., 2011).

Zajedno sa intestinalnim epitelijalnim ćelijama (IEĆ) dendritične ćelije (DĆ) i makrofazi stalno nadgledaju situaciju u sredini i koordinišu različite vidove odbrane okolnog tkiva. Urođeni mehanizmi odbrane uključuju pomenute antimikrobne supstance i sekreciju hemokina kao što je IL-8 koji privlači neutrofile koji fagocitiraju mikroorganizme ili njihove delove (Artis, 2008). Mukozni imuni sistem koji je u asocijaciji sa crevima (“gut-associated lymphoid tissues” - GALT), čini najveću masu limfoidnog tkiva u ljudskom telu. GALT čini više limfoidnih tkiva i to: Pejerove pločice i izolovani limfoidni folikuli, koji zajedno čine induktivna mesta GALT-a. Najbolje opisana efektorna

komponenta mukoznog adaptivnog imunog sistema je sIgA koji zajedno sa urođenim sistemima mukozne odbrane omogućava zaštitu: inhibira kolonizaciju patogenih bakterija i penetraciju patogenih agenasa kroz mukožu. IgA je najviše produkovan u imunoglobulin u ljudskom telu i njegova produkcija zahteva prisustvo komensalnih mikroorganizama (Adolfsson et al., 2004). U mezenteričnim limfnim čvorovima intravaskularne naivne T ćelije postaju aktivirane i doprinose formiranju Th1 i/ili Th17 efektornih ćelija. Efektorne ćelije napuštaju limfne čvorove i ulaze u sistemsku cirkulaciju i vraćaju se u creva gde pomažu uništavanje patogena. U nedostatku pravilnih regulatornih mehanizama, može doći do hronične intestinalne inflamacije ako je isti odgovor domaćina i na komensalne mikroorganizme (Koboziev et al., 2010). Poslednjih 50 godina, sa razvojem metoda rada sa "germ-free" (GF) laboratorijskim životinjama, otkriveni su mnogi detalji posledica simbiotskog odnosa između sisara i komensalnih mikroorganizama. S obzirom da je u početku eksperimenata sa GF životinjama bila visoka stopa smrtnosti, uočeno je da komensalni mikroorganizmi u intestinumu proizvode esencijalne vitamine (K i B-12), nutrijente i pomažu u varenju. GF miševi imaju manje razvijen GALT: manje intraepitelijalnih limfocita i limfocita u lamina propria, manje Pejerovih pločica, mali broj zrelih izolovanih limfoidnih folikula i drastično smanjen nivo IgA. Antigen prezentujuće dendritične ćelije usvajaju komensalne i patogene bakterije na mukoznim površinama. Ključnu ulogu u aktivaciji ćelija imunog sistema imaju "toll-like" receptori (TLRs) ćelija domaćina koji prepoznaju specifične molekulske paterne bakterija, gljiva ili virusa (O'Hara et al., 2006). Modulacija funkcije DĆ i indukcija regulatornih T ćelija (Treg) je posebno važna kao potencijalni mehanizam akcije probiotika. S tim u vezi, ukoliko nema izlaganja organizma određenim bakterijama koje su koevoluirale sa GIT-om domaćina može doći do povećane stope hroničnih oboljenja (alergija i inflamatorne bolesti creva). Laktobacili se smatraju bakterijama koje su, između ostalih, posebno važne za imunoregulatorne odgovore, za indukovanje DĆ i Treg (Rook and Brunet, 2005). Mada postoje razlike između vrsta laktobacila, najveći broj istraživanja je pokazao da većina laktobacila modulišu funkciju DĆ jer utiču na njihovo sazrevanje, aktivaciju molekula za antigen prezentaciju T ćelijama ili indukuju regulatorne citokine (npr. IL-10). Postoje razlike među DĆ poreklom iz mezenteričnih čvorova i periferne krvi. Tako DĆ iz mezenteričnih čvorova u prisustvu *Lb. salivarius* UCC118 proizvode IL-10 i TGF- β , dok one iz periferne krvi

produkuju IL-12. Interesantno je da *S. enterica* ser. Typhimurium stimuliše produkciju IL-12 kod oba tipa DC, što ukazuje da obe populacije ćelija isto odgovaraju na prisustvo patogena (O'Mahony et al., 2006). Kod *Lb. johnsonii* La1 proteini koji imaju ulogu u adheziji za GIT stimulišu sekreciju IL-8 u HT29 ćelijskoj liniji (Bergonzelli et al., 2006; Granato et al., 2004). EPS molekuli, a pogotovu HePS indukuju mukozni imuni odgovor. EPS soja *Lb. kefiranofaciens* ATCC43761 u nešto većim koncentracijama (2 mg dnevno) indukuje IgA pozitivne ćelije kod miševa, a *Lb. rhamnosus* RW-9595 M stimuliše TNF- α , IL-6 i IL-12 u humanim limfocitima periferne krvi i makrofazima, a u splenocitima IFN- γ (Chabot et al., 2001). Polisaharid vezan za ćelijski zid kod *Lb. casei* Shirota redukuje pojačani imuni odgovor tokom aktivacije makrofaga (Lebeer et al., 2008). Može se zaključiti da iako je lokalizacija i organizacija GALT-a genetički programirana, od signala koje šalju mikroorganizmi zavisi njegoa maturacija (Chinen and Rudensky, 2012).

1.7. Prirodni izolati laktobacila

Srbija zajedno sa ostalim zemljama Zapadnog Balkana pripada evropskoj regiji sa dugogodišnjim iskustvom u pravljenju tradicionalnih mlečnih proizvoda. Ovi proizvodi se prave u domaćinstvima na specifičnim ekološkim lokalitetima kao što su visoke planine, rečne doline, ostrva ili morska obala koje su izvor autohtonih vrsta i sojeva BMK. Tradicionalni fermentisani proizvodi se prave koristeći kravlje, kozije ili ovčije mleko (posebno ili mešavine) bez korišćenja starter kultura. Većina proizvoda se pravi od nepasterizovanog mleka, tako da raznovrsnost BMK koje su prisutne u proizvodu zavisi od mikroflore sredine i specifične mikroflore svežeg mleka. BMK poreklom iz tradicionalnih proizvoda mogu naći primenu u industriji hrane zbog davanja specifičnog ukusa, arome, teksture i hranljivih vrednosti samog proizvoda (McKay and Baldwin, 1990). BMK pokazuju dobru koagulaciju proteina mleka, povećavaju kiselost proizvoda i mogu se primeniti u prevenciji kvarenja hrane i produžavanja roka upotrebe fermentisanih proizvoda (Stiles, 1996). Prirodni izolati BMK su proizvođači antimikrobnih supstanci koje mogu da ispoljavaju svoj efekat na patogene bakterije, sintetišu ekstracelularne proteinaze i EPS molekule (Topisirovic et al., 2006; Terzic-Vidojevic et al., 2007; Nikolic et al., 2008). BMK iz tradicionalnih proizvoda sintetišu bakteriocine, antimikrobne supstance proteinske

prirode koji ubijaju srodne bakterije (Lozo et al., 2007). Pošto laktobacili imaju GRAS status, oni ili njihovi bakteriocini mogu da se koriste u proizvodnji i konzervisanju hrane. U poslednje vreme se proizvodi funkcionalna hrana koja ima jednu ili više komponenti koje pružaju organoleptičku, tehnološku, hranljivu ili zdravstvenu prednost u odnosu na drugu vrstu hrane (Leroy and de Vuyst, 2004). Tako, pored upotrebe u industriji hrane radi poboljšanja i održanja kvaliteta proizvoda, sve se više vrše istraživanja u smeru analize potencijalnih probiotičkih osobina prirodnih izolata iz mlečnih proizvoda (Portier et al., 1993).

U kolekciji Laboratorije za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama (BG kolekcija) identifikovani su sojevi BMK koji ispoljavaju osobinu autoagregacije. Autoagregacija je prisutna kod laktokoka, laktobacila i leukonostoka (Kojic et al., 2011; Nikolic et al., 2010). Neretko jedan soj ispoljava više značajnih karakteristika, kao što je *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5, koji proizvodi tri tipa bakteriocina (bakteriocin 501, LsbA i LsbB), sintetiše ekstracelularnu proteinazu PI tipa i poseduje sposobnost autoagregacije. Derivat BGMN1-501 ne sintetiše bakteriocine LsbA i LsbB, ali sintetiše proteinazu i agregira. Derivat BGMN1-513 je izgubio mogućnost sinteze bakteriocina 501 i ne sintetiše proteinazu, niti ima sposobnost agregacije, tako da se pretpostavlja da je u ovom slučaju agregacija povezana sa sintezom ekstracelularne proteinaze (Gajic et al., 1999.). Kod *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGKP1, gen koji je odgovoran za agregaciju (*aggL*) je lokalizovan na plazmidu pKP1 (16,2 kb), kloniran i eksprimiran u homologom i heterologom domaćinu (laktokoka i enterokoka) (Kojic et al., 2011). Što se tiče laktobacila, uočeno je da najveći broj predstavnika koji autoagregiraju pripada grupi *Lb. casei*. Jedan predstavnik *Leuconostoc mesenteroides* BGNJ1-45 agregira, ali znatno slabije u odnosu na laktobacile, koji su međusobno ispoljavali izrazitu raznovrsnost po pitanju morfologije agregata i brzine autoagregacije (Nikolic et al., 2010). Posebno je interesantan soj *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 koji pored autoagregacije sintetiše i bakteriocine, a rekultivacijom soja iz stoka sa - 80°C na 30°C je dobijen i BGSJ2-81 izogeni derivat koji je izgubio sposobnost autoagregacije (Lozo et al., 2007).

Pored pomenute osobine agregacije, BG kolekcija sojeva BMK izolovanih iz autohtonih, domaćih sireva sadrži i sojeve koji produkuju EPS (Ciric et al., 1990). Do sada je detaljnije okarakterisan EPS koji proizvodi *Lb. casei* BGCG11 (preliminarna

determinacija na osnovu fermentacije šećera) (Kojic et al., 1992; Cerning et al., 1994). *Lb. casei* BGCG11 (izolovan iz polutvrdog belog sira, selo Adrovići, Crna Gora) produkuje heteropolisaharid označen kao EPS-CG11. Produkcija ovog EPS polimera zavisi od uslova kultivacije, tako da se više produkuje na nižoj temperaturi rasta od optimalne. Produkcija EPS-a zavisi i od medijuma koji se koristi za gajenje, tako da se u bogatom medijumu, ili u minimalnom medijumu sa različitim šećerima menja i nivo produkcije i sastav EPS-CG11 molekula (Cerning et al., 1994). Interesantno je da su dobijeni Muc⁻ derivati čišćenjem plazmida parentalnog soja BGCG11 subletalnom temperaturom (ST) ili novobiocinom (NB derivati) (Kojic et al., 1992). Ovi derivati su izgubili rastegljivost ("ropy") fenotip i produkciju EPS-CG11. Osobina rastegljivosti kolonija je karakteristična za određen tip EPS molekula kada se formira filament od bakterijskih ćelija u matriksu EPS-a. Muc⁻ derivati produkuju rezidualni EPS u do 10 puta nižoj količini u odnosu na parentalni soj BGCG11. Rezidualni EPS je različitog sastava od EPS-CG11 (Cerning et al., 1994). U istom radu je pokazano da soj BGCG11 u minimalnom medijumu sa glukozom produkuje EPS-CG11 koji se sastoji prvenstveno od glukoze (75,7%), ramnoze (20,5%), galaktoze (2,1%) i manoze (1,7%), dok u istim uslovima derivat NB1 produkuje EPS koji se sastoji prvenstveno od glukoze (86,6%), manoze (6,2%), galaktoze (4,1%) i ramnoze (3,1%). Na osnovu prethodno dobijenih rezultata koji su pokazali da Muc⁻ derivati ne sadrže plazmid veličine oko 30 kb, pretpostavljeno je da je genetička informacija za sintezu EPS-CG11 locirana na tom velikom plazmidu (Kojic et al., 1992).

Na kraju, potrebno je naglasiti da tradicionalni fermentisani proizvodi predstavljaju nezamenljiv izvor sojeva BMK sa specifičnim karakteristikama, a formiranjem kolekcije različitih sojeva, kao što je BG kolekcija, čuva se biodiverzitet BMK. Sa stanovišta koncepta probiotika, osnovna ideja je da se analizira što veći broj prirodnih izolata sa specifičnim površinskim karakteristikama, u cilju testiranja selekcionih kriterijuma za odabir probiotika, što bi omogućilo potencijalnu primenu novih probiotičkih sojeva u funkcionalnoj hrani (Jensen et al., 2012).

3. CILJ RADA

Prirodni izolati laktobacila su predmet istraživanja već dugi niz godina. Površinske osobine laktobacila u velikoj meri odražavaju njihov probiotički potencijal, s obzirom da površinski molekuli ćelija bakterija učestvuju u specifičnim interakcijama bakterija sa spoljašnjom sredinom, drugim bakterijama ili eukariotskim ćelijama. Zato su ciljevi ovog rada bili:

1. Analiza tipa autoagregacije i karakterizacija prirode faktora koji utiču na sposobnost autoagregacije izabranih sojeva laktobacila kao i na sposobnost koagregacije soja *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 sa drugim vrstama bakterija.

2. Analiza površinskih osobina odabranih sojeva laktobacila - adhezija na heksadekan.

Soj *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11, producent egzopolisaharida EPS-CG11 je izabran za detaljniju analizu probiotičkog potencijala i u ovom delu rada ciljevi su bili:

3. Preživljavanje EPS producenta BGCG11 i Muc⁻ derivata (NB1, NB4, NB16) u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta (GIT).

4. Stabilnost prečišćenog EPS-CG11 u uslovima simuliranog prolaska kroz GIT.

5. Adhezija soja BGCG11 i Muc⁻ derivata NB1, NB4 i NB16 na epitelijalne intestinalne ćelijske linije Caco-2, HT29 i HT29-MTX.

6. *In vitro* odgovor limfocita iz periferne krvi u prisustvu BGCG11, Muc⁻ derivata i prečišćenog EPS-CG11 (proliferacija limfocita i produkcija citokina).

7. Analiza uticaja patogenih mikroorganizama i soja BGCG11 na HT29-MTX ćelijsku liniju (analiza citotoksičnog efekta patogenih bakterija na HT29-MTX ćelije i analiza nivoa produkcije IL-8 u HT29-MTX ćelijskoj liniji u prisustvu različitih patogena i laktobacila).

8. Lokalizacija operona odgovornog za biosintezu EPS-CG11 u soju *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11.

9. Analiza DNK sekvence operona za EPS-CG11.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Bakterijski sojevi

Bakterijski sojevi koji su korišćeni u ovom radu su prikazani u Tabeli 2.

Tabela 2. Bakterijski sojevi korišćeni u radu

Bakterijski soj	Relevantne karakteristike	Izvor ili referenca
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>		
BGSJ2-8	Agg ⁺ , Prt ⁺ , Bac ⁺	Lozo et al., 2007
BGSJ2-81	Agg ⁻ , Prt ⁺ , Bac ⁺	Lozo et al., 2007
<i>Lactobacillus paracasei</i>		
BGAR75	Agg ⁺ , Prt ⁺ , antimikrobna aktivnost	Nikolić et al., 2009
BGAR76	Agg ⁻ , Prt ⁺ , antimikrobna aktivnost	Nikolić et al., 2009
BGGR2-68	Agg ⁺	Nikolic et al., 2010
BGGR2-82	Agg ⁺	Nikolic et al., 2010
BGDP9-85	Agg ⁺ , Prt ⁺	Nikolic et al., 2010
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>		
BGGR2-20	Agg ⁻ , Prt ⁺	Nikolic et al., 2010
BGDP1-84	Agg ⁺	Nikolic et al., 2010
BGNJ1-3	Agg ⁺ , Prt ⁺	Nikolic et al., 2010
BGNJ1-61	Agg ⁺ , Prt ⁺ , antimikrobna aktivnost	Nikolic et al., 2010
BGNJ1-70	Agg ⁺ , antimikrobna aktivnost	Nikolic et al., 2010
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		
BGDU4-71	Agg ⁺ , Prt ⁺	Nikolic et al., 2010
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>		
BGCG11	EPS-CG11	Kojic et al., 1992
BGCG11-NB1	Muc ⁻ , derivat BGCG11	Lab. kolekcija
BGCG11-NB4	Muc ⁻ , derivat BGCG11	Lab. kolekcija
BGCG11-NB16	Muc ⁻ , derivat BGCG11	Lab. kolekcija
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMG18243 (GG)		BCCM/LMG kolekcija
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090		ATCC kolekcija
<i>Listeria monocytogenes</i> LMG13305		BCCM/LMG kolekcija
<i>Clostridium difficile</i> LMG21717		BCCM/LMG kolekcija
<i>Cronobacter sakazakii</i> LMG5740		BCCM/LMG kolekcija
<i>Shigella sonnei</i> LMG10473		BCCM/LMG kolekcija
<i>Yersinia enterocolitica</i> LMG7899		BCCM/LMG kolekcija
<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium LMG15860	Derivat LT-2, <i>hisD3052</i> , <i>rfa-</i> , <i>uvrB</i> .	BCCM/LMG kolekcija
TR251	<i>hisC527</i> , <i>cysA1348</i> , <i>sup-501</i>	John Roth
<i>Escherichia coli</i>		
LMG2092		BCCM/LMG kolekcija
ATCC25922		ATCC kolekcija
DH5 α	F ⁻ , Δ <i>lac</i> , <i>U169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983

Agg⁺ – prisustvo autoagregacije
 Agg⁻ – odsustvo autoagregacije
 Prt⁺ – prisustvo proteinazne aktivnosti
 Bac⁺ – producent bakteriocina
 EPS-CG11 – producent egzopolisaharida EPS-CG11, pokazuje rastegljiv fenotip
 Muc⁻ – izgubljena sposobnost produkcije EPS-CG11 i rastegljivog fenotipa

3.2. Korišćeni plazmidi

Plazmidi koji su korišćeni u ovom radu su prikazani u Tabeli 3.

Tabela 3. Plazmidi korišćeni u radu

Plazmidi i konstrukti	Relevantne karakteristike	Izvor ili referenca
pAZIL	Em ^f , 7109 bp	Kojic et al., 2011
pAZIL1-13Bam	<i>Bam</i> HI fragment dužine 18466 bp kloniran u pAZIL, Em ^f	Ovaj rad
pAZIL650Eco	<i>Eco</i> RI fragment dužine 657 bp kloniran u pAZIL, Em ^f	Ovaj rad
pAZILSB9	<i>Sac</i> I- <i>Bam</i> HI fragment dužine 1334 bp kloniran u pAZIL, Em ^f	Ovaj rad
pAZILCG1-8	<i>Bcl</i> II fragment dužine 3022 bp kloniran u pAZIL, Em ^f	Ovaj rad
pAZIL85Bgl	<i>Bgl</i> II fragment dužine 4272 bp kloniran u pAZIL, Em ^f ,	Ovaj rad

Em^f – rezistencija na eritromicin

3.3. Podloge za rast bakterija

Za gajenje bakterija roda *Lactobacillus* korišćen je MRS medijum (Merck, GmbH Darmštad, Nemačka). Bakterije su gajene na 30°C osim *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BGDU4-71 koji je gajen anaerobno na 37°C sa ANAEROCULT[®] A (Merck). *Lb. rhamnosus* LMG18243 (komercijalno ime GG), korišćen kao kontrolni soj, je gajen u MRS medijumu sa 0,05% L-cisteinom (Sigma, Nemačka) na 37°C, 5% CO₂ u Heracell[®] 240 inkubatoru (Thermo Electron LDD GmbH, Lagenselbold, Nemačka).

Sojevi *Clostridium difficile* LMG21717, *Salmonella enterica* ser. Thyphimurium LMG15860, *Listeria monocytogenes* LMG13305, *Cronobacter sakazakii* LMG5740, *Escherichia coli* LMG2092, *Shigella sonnei* LMG10473 i *Yersinia enterocolitica* LMG7899 su gajeni u Brain Heart Infusion (BHI) medijumu (Oxoid, Bejzingstouk, Hempšajer, Engleska). *L. monocytogenes* LMG13305 je inkubirana na 37°C, *E. coli* LMG2092 na 37°C sa aeracijom (mešanje na 180 rpm). Ostali sojevi su inkubirani na

37°C sa 5% CO₂ u Heracell[®] 240 inkubatoru (Thermo Electron LDD GmbH, Langensfeld, Nemačka).

L. innocua ATCC33090 i *E. coli* ATCC25922 su gajene u Luria-Bertani (LB) mediumu (1% tripton, 0,5% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca) na 37°C (mešanje na 180 rpm za *E. coli*). *S. enterica* ser Typhimurium TR251 je gajena u Nutrient Broth sa 4 g/l NaCl (Difco, Detroit, MI, SAD) pod istim uslovima gajenja kao i *E. coli*.

E. coli DH5 α , transformisani odgovarajućim vektorom, su gajeni u LB medijumu sa odgovarajućim antibiotikom (eritromicin 250 μ g/ml).

Čvrste podloge za rast su dobijene dodavanjem agara 15 g/l, pre sterilizacije.

3.4. Metode izolacije DNK

3.4.1. Metoda izolacije ukupne DNK iz laktobacila

Izolacija ukupne DNK iz laktobacila rađena je po prethodno opisanoj metodi (Hopwood et al., 1985). Talog dobijen centrifugiranjem bakterija iz 10 ml logaritamske kulture (OD₆₀₀=0,6-0,8) opran je u 500 μ l TEN pufera (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 50 mM NaCl) i resuspendovan u 500 μ l PP pufera (0,5 M saharoza, 40 mM NH₄-acetat, 10 mM Mg-acetat pH 7) sa lizozimom (7 mg/ml). Smeša je inkubirana 30 min na 37°C, a zatim je dodavano 250 μ l 2% rastvora SDS-a. Smeša je intenzivno vorteksovana 1 min tj. sve dok viskozitet nije postao приметно manji. Odstranjivanje proteina je rađeno dodavanjem smeše fenol-hloroforma i centrifugiranjem (15 min na 13000 rpm u centrifugi 5804, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Prečišćavanje fenolom je ponavljano više puta do gubitka interfaze. Dobijeni supernatant je prebačen u nove mikrotube u koje je dodavana 1/10 volumena (zapremine) 3 M Na-acetata i 1 volumen (zapremina) izopropanola. DNK je taložena centrifugiranjem na 13000 rpm 10 min (centrifuga 5804). Pranje DNK vršeno je 75%-tnim etanolom. DNK je zatim sušena na sobnoj temperaturi i resuspendovana u 50 μ l bidestilovane H₂O. Dodavanjem 1 μ l RNaze (10 mg/ml) RNK je odstranjivana inkubacijom uzorka na 37°C u trajanju od 30 min.

3.4.2. Izolacija velikih količina plazmidne DNK iz laktobacila

Ukupna DNK iz laktobacila izolovana je prema metodi koju su opisali Anderson i McKay, 1983. Talog iz 500 ml logaritamske kulture bakterija ($OD_{600}=0,6-0,8$) je opran u vodi, resuspendovan u 12,5 ml STE pufera (6,7% saharoza, 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) i zagrevan na 37°C. Dodavan je lizozim u koncentraciji od 7 mg/ml i smeša je inkubirana 5-10 min na 37°C. Zatim je dodavano 3,15 ml rastvora 0,25 M EDTA i 50 mM Tris-HCl pH 8, a potom i 0,9 ml 20% SDS. Nakon toga vršeno je intenzivno mešanje na vorteksu u trajanju od 1 min ili dok viskozitet rastvora nije postao приметно manji. Posle ovog koraka smeša je inkubirana 5-10 min na 37°C, a nakon toga je dodavan 1 ml 3 M NaOH. Posle blagog mešanja u lizat je dodavano i 1,65 ml 2 M Tris-HCl pH 7. Kad je smeša dobro izmešana dodavano je 2,4 ml 5 M NaCl. Smeša je centrifugirana 30 min na 4°C pri brzini od 18000 rpm (Sorvall centrifuga). Dobijeni supernatant je prebacivan u čiste epruvete, dodavana je jedna zapremina fenol-hloroforma i centrifugirano je 15 min na 4°C pri brzini od 7000 rpm (SS34 rotor, Sorvall centrifuga). Dobijeni supernatant je prebacivan u čiste epruvete i precipitiran sa 2,5 zapremine etanola (96%, -20°C) preko noći na -20°C. Nakon centrifugiranja 20 min pri brzini od 10000 rpm (Sorvall centrifuga) talog je ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C, 20 ml), sušen i resuspendovan u TE puferu. RNK je odstranjivana inkubacijom sa RNazom (100 µl, 10 mg/ml) 60 min na 37°C.

3.4.3. Prečišćavanje DNK u gradijentu CsCl

Na mililitar rastvora DNK, dobijenog u procesu izolacije, dodavan je 1 g čvrstog CsCl i rastvor etidijum bromida (0,4 ml, koncentracije 10 mg/ml, na 10 ml rastvora). Rastvor je prenošen u epruvete za Beckman Ti50 rotor. Ravnotežno (izopikničko) razdvajanje plazmidne i hromozomalne DNK je vršeno centrifugiranjem 36 h na 20°C pri brzini od 45000 rpm (Ti50 rotor, Beckman ultracentrifuga). Centrifugiranjem u gradijentu CsCl i EtBr dolazi do razdvajanja plazmidne (donja traka) i hromozomalne DNK (gornja traka). Nakon izvlačenja špricom posebno hromozomalne i plazmidne DNK, postupilo se dodatnom prečišćavanju izoamil alkoholom (u odnosu zapremina 1:1) da bi se odstranio etidijum bromid, dok je CsCl odstranjen dijaliziranjem prema TE puferu pH 7,5 velike zapremine.

3.4.4. Metode izolacije velike količine plazmidne DNK iz *E. coli*

Velika količina plazmidne DNK iz *E. coli* izolovana je korišćenjem kita "QIAGEN Plasmid Mini-Prep Kit" (Qiagen, Nemačka) po uputstvu proizvođača.

3.4.5. Mini-metoda izolacije plazmidne DNK iz *E. coli*

Izolacija malih količina plazmidne DNK iz *E. coli* rađena je po modifikovanoj metodi "JETSTAR Plasmid Kit-MINI" (Genomed, GmbH, Austrija). Čelije *E. coli* iz prekonoćne kulture (3 ml) su taložene centrifugiranjem (1 min, 13000 rpm, centrifuga 5418, Eppendorf), a zatim resuspendovane u 200 µl rastvora za resuspendovanje ćelija (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, finalno pH 8) koji sadrži RNazu. Dobijena suspenzija je homogenizovana intenzivnim mešanjem, a zatim je dodato 200 µl rastvora za lizu ćelija (200 mM NaOH i 1% SDS). Neutralizacija liziranih ćelija je vršena dodavanjem 200 µl rastvora za neutralizaciju (3,1 M K-acetat, sirćetna kiselina, finalno pH 5,5), smeša je intenzivno mešana i centrifugirana 10 min na 13000 rpm u centrifugi 5418 (Eppendorf). Supernatant je prenetu novu mikrotubu u koju je dodato 50 µl neutralnog fenola, smeša je intenzivno promešana, a zatim centrifugirana 5 min na 13000 rpm u centrifugi 5418, nakon čega je supernatant prebačen u novu mikrotubu i pomešan sa 0,7 zapremina izopropanola. Plazmidna DNK je taložena centrifugiranjem na 13000 rpm 10 min (centrifuga 5418). Pranje DNK vršeno je 75%-tnim etanolom. Nakon sušenja u vakuum uparivaču, plazmidna DNK je resuspendovana u bidestilovanoj H₂O.

3.5. Enzimske reakcije sa DNK

3.5.1. Umnožavanje DNK fragmenta PCR metodom ("Polymerase Chain Reaction")

Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom rađeno je tako što je pripremljena reakciona smeša koja sadrži: 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 200 µM dezoksinukleotidi (dNTP), dva prajmera (5 pM) i 1 U *Taq* DNK polimeraze (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija) ili sa "KAPA *Taq* DNA polymerase kit" (Kapa Biosystems, MA, SAD) i inkubirana sa matricom DNK (0,1 µg).

U cilju molekularne determinacije izolata laktobacila vršeno je umnožavanje dela sekvence gena za 16S rRNK uz pomoć parova odgovarajućih prajmera UNI16SF (5'-GAG AGT TTG ATC CTG GC-3') i UNI16SR (5'-AGG AGG TGA TCC AGC CG-3') (Jovicic et al., 2009). PCR reakcija je rađena po sledećem programu: početna denaturacija 7 min na 94°C, umnožavanje DNK fragmenata u 30 ciklusa: denaturacija 30 s na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 50°C, polimerizacija 30 s 72°C; poslednji ciklus polimerizacije je 7 min na 72°C.

Dobijeni PCR produkti su prečišćavani propuštanjem kroz kolonice QIAquick PCR Purification KIT/250 (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka) i sekvencirani u servisu za sekvenciranje Macrogen, Seul, Koreja. Sekvence su poređene sa NCBI bazom podataka, BLAST programom za pretraživanje homologe nukleotidne sekvence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja *Lb. paraplantarum* BGCG11 je sačuvana u "European Nucleotide Archive" (EMBL) bazi podataka (<http://www.ebi.ac.uk/ena>) pod brojem HE600693.

Konačna determinacija BGCG11 soja kao *Lb. paraplantarum* je urađena AFLP metodom u Laboratoriji za mikrobiologiju, Univerziteta u Gentu ("Laboratory for Microbiology of Ghent University"), Gent, Belgija.

3.5.2. Sečenje restrikcionim enzimima

Sečenje restrikcionim endonukleazama (Sambrook et al., 1989) je rađeno u komercijalnim puferima prema uputstvu proizvođača (Fermentas).

3.5.3. Defosforilacija 5' slobodnih krajeva DNK fragmenata

Defosforilacija 5' slobodnih krajeva DNK fragmenata vršena je sa "Antarctic phosphatase" (New England BioLabs, MA, SAD) po uputstvu proizvođača: DNK (1-20 ng) rastvorena u 1 × reakcionom puferu (50 mM Bis Tris-propan, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂, pH 6) inkubirana je sa 0,1 U enzima, 15 min na 37°C. Enzim je na kraju reakcije termički inaktiviran 5 min na 65°C.

3.5.4. Ligacija DNK fragmenata

Ligacija fragmenata DNK (Maniatis et al., 1982) je rađena tako što su DNK fragmenti sa komplementarnim lepljivim krajevima, u finalnoj količini od 200 ng,

inkubirani 16 h na 16°C sa 1 U T4 DNK ligaze (Promega, Madison, SAD) u ligacionom puferu (10 mM MgCl₂, 10 mM ditioneitol, 1 mM spermidin, 1 mM ATP, 100 µg/ml BSA, 50 mM Tris-HCl, finalno pH 7,4).

3.6. DNK-DNK hibridizacija

3.6.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane

U cilju lokalizacije operona za sintezu EPS-CG11 korišćena je DNK-DNK hibridizacija. Plazmidne DNK, izolovane iz soja *Lb. paraplantarum* BGCG11 i iz Muc⁻ derivata NB1, su sećene restrikcionim enzimima i razdvojene na 1% agaroznom gelu. DNK je prenošena sa gela na najlonske membrane po metodi Southern-a (1975). Po završetku elektroforeze, agarozni gel je tretiran sa 0,25 M HCl tokom 15 min, da bi se ostvarilo delimično prekidanje molekula DNK uzrokovano depurinacijom. Gel je zatim ispiran u destilovanoj vodi, a denaturacija DNK je vršena potapanjem gela 2 puta po 15 min u rastvor koji sadrži 0,5 M NaOH i 1,5 M NaCl (denaturacioni rastvor). Pre transfera gel je neutralisan u neutralizacionom puferu (1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, finalno pH 7,5) inkubacijom 2 puta po 20 min. Za sledeću fazu eksperimenta pripremani su listovi Whatman 3 MM filter papira odgovarajućih dimenzija. Najlonska membrana (SensiBlotPlus Nylon Membrane, MBI Fermentas, Litvanija), na koju će DNK biti prenet, je isećena veličine po 2 mm veća sa svake strane od gela, zatim je potapana na kratko u 20 × SSC puferu (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-citrat, finalno pH 7). Dva lista 3 MM papira, veća od gela, su potapana u 20 × SSC pufer i slagana jedan na drugi. Na njih je stavljan tretiran gel, tako da je strana sa DNK bila okrenuta na gore, a oko gela su stavljeni graničnici. Preko gela je stavljena najlonska membrana, a preko nje još dva 3 MM papira navlažena u 20 × SSC puferu. Pri stavljanju papira vođeno je računa da mehurići vazduha ne ostanu zarobljeni između papira. Na kraju je preko svega stavljen 10 cm deo sloj upijajućeg papira i sve je ravnomerno opterećeno tegom od 1 kg. Transfer je vršen preko noći u 20 × SSC puferu.

Posle završenog transfera najlonska membrana je skinuta i dva puta potopljena u 5 × SSC pufer u trajanju od 5 min. Fiksiranje DNK za membranu je rađeno tako što je prosušena membrana stavljena između dva 3 MM papira, a zatim držana u pećnici 2 sata na temperaturi od 80°C.

3.6.2. Obeležavanje DNK probe digoksinom

Specifične probe koje su korišćene u eksperimentima DNK-DNK hibridizacije obeležavane su sa "DIG DNA Labeling and Detection Kit" (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Nemačka). Ovaj protokol se bazira na hibridizaciji nasumičnih ("random") oligonukleotida za denaturisanu DNK probu ("random primed labeling"). Komplementarni lanac DNK sintetiše se pomoću Klenow enzima koji koristi 3'-OH kraj "random" oligonukleotida kao prajmer i mešavine dezoksioligonukleotida sa digoksinom (DIG-11-dUTP) za produžavanje lanca DNK. DIG-11-dUTP se ugrađuje u novosintetisanu DNK na svakih 20-25 nukleotida. U 1 µg probe (PCR proizvod) je dodavana smeša koja se sastoji od: 2 µl dNTP smeše za obeležavanje (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP i 0,65 mM dTTP i 0,35 mM DIG-11-dUTP pH 7,5), 2 µl mešavine heksanukleotida (10 × koncentrisan) i Klenow enzim za obeležavanje (2 U/µl), a finalna zapremina do 15 µl podešena je destilovanom vodom. Dobijena smeša je promešana, kratko centrifugirana i inkubirana preko noći na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8) i dobijena smeša je prečišćena od neinkorporisanih nukleotida precipitacijom 100%-tnim etanolom. Pre hibridizacije proba je denaturisana kuvanjem 10 min na temperaturi od 100°C, a zatim prebačena na led do sledećeg koraka hibridizacije. Ovako je dobijena neradioaktivno obeležena proba.

3.6.3. Neradioaktivna DNK-DNK hibridizacija

Procedura za hibridizaciju DNK sa neradioaktivno obeleženom probom je bila sledeća: membrana je pakovana u kesicu i inkubirana 1 h na temperaturi od 65°C sa 10 ml hibridizacionog pufera (5 × SSC, 0,1% N-lauril sarkozil, 0,02% SDS, 1% kazein). Nakon toga, u kesicu je sipan 1 ml svežeg hibridizacionog pufera na 10 cm² membrane u koji je prethodno dodata neradioaktivno obeležena i denaturisana proba. Hibridizacija je vršena preko noći (16 h) na 65°C. Membrana je nakon hibridizacije oprana dva puta u rastvoru I (2 × SSC, 0,1% SDS) na sobnoj temperaturi, a zatim dva puta u rastvoru II (0,5 × SSC, 0,1% SDS) na temperaturi od 65°C. Za detekciju DNK-DNK hibrida korišćen je "DIG DNA Labeling and Detection Kit". Proces detekcije je uključivao:

- 1) vezivanje hibridizovane probe sa anti-digoksinom-AP i Fab fragmentima konjugovanim sa alkalnom fosfatazom;
- 2) vizualizaciju sa kolorimetrijskim supstratima NBT/BCIP koji reaguju sa

alkalnom fosfatazom.

Pranje membrane i detekcija hibrida su vršeni po uputstvu proizvođača (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Nemačka).

3.7. Transformacija *E. coli* DH5 α ćelija

3.7.1. Priprema kompetentnih *E. coli* DH5 α ćelija

Kompetentne *E. coli* ćelije su pripremane po modifikovanoj proceduri sa rubidijum hloridom (Hanahan, 1985). 100 ml LB medijuma inokulisano je po jednom kolonijom na 10 ml medijuma i ćelije su gajene na 37°C, uz snažnu aeraciju na 180 rpm, do optičke gustine kulture od 0,5 na 600 nm. Rast bakterijske kulture zaustavljan je hlađenjem 15 min na ledu. Nakon inicijalnog hlađenja bakterije su taložene centrifugiranjem (25 ml kulture po epruveti) 10 min na 5000 rpm, 4°C u centrifugi 5804R (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Supernatant je odlivan, a talog resuspendovan, laganim mešanjem, u 25 ml prethodno ohlađenog 0,1 M CaCl₂ i ostavljen na ledu 15 min. Ćelije su zatim ponovo centrifugirane 10 min na 3500 rpm pri temperaturi od 4°C u centrifugi 5804R, a talog je resuspendovan u 2 ml RF2 pufera (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂·2H₂O, 15% glicerol, finalna pH vrednost 6,8). Suspenzija ćelija deljena je u alikvote od po 200 μ l, koji su naglo zamrznuti u tečnom azotu, a zatim čuvani na -80°C.

3.7.2. Transformacija kompetentnih *E. coli* DH5 α ćelija temperaturnim šokom (“Heat shock”)

Transformacija kompetentnih *E. coli* DH5 α vršena je izlaganjem ćelija toplotnom šoku u prisustvu DNK. Prilikom korišćenja, zamrznute ćelije su otapane na ledu. Suspenziji otopljenih ćelija dodavana je DNK (u zapremini do 20 μ l, ukupne količine DNK ne više od 200 ng), a zatim je inkubirana 60 min na ledu. Nakon inkubacije ćelije su izlagane temperaturnom šoku (ujednačiti terminologiju) u trajanju od 90 sekundi na 42°C, a zatim su odlagane 5 min na led. Nakon transformacije ćelije su oživljavane dodavanjem 300 μ l neselektivnog LB medijuma i inkubiranjem uz intenzivnu aeraciju od 30 do 60 min na 37°C. Ćelije su zatim razmazivane (utrljavane) na selektivne podloge i inkubirane na 37°C do pojave transformanata.

3.8. Elektroforeza DNK

Elektroforeza DNK je rađena na horizontalnim 1% agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani rastvaranjem agaroze u $1 \times$ TAE (40 mM Tris–acetat, 1 mM EDTA) puferu uz dodavanje etidijum bromida (0,5 $\mu\text{g/ml}$). Kao pufer za elektroforezu korišćen je $1 \times$ TAE pufer. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela.

Veličine fragmenata DNK dobijenih posle sečenja restrikcionim enzimima određivane su na agaroznim gelovima upoređivanjem dužine puta DNK trake koja se ispituje u odnosu na dužinu puta koju su prešli DNK fragmenti poznate veličine. Korišćen je sledeći DNK standard:

-“GeneRuler DNA ladder mix” (MBI Fermentas, Vilnius, Litvanija): 10000 bp, 8000 bp, 6000 bp, 5000 bp, 4000 bp, 3500 bp, 3000 bp, 2500 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1200 bp, 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp.

3.9. Elucija DNK fragmenata

Elucija DNK fragmenata dobijenih PCR metodom ili digestijom DNK restrikcionim enzimima iz agaroznog gela vršena je pomoću “QIAquick Gel Extraction Kit” (Qiagen, Nemačka) po uputstvu proizvođača.

3.10. Metode analize agregacije i površinskih karakteristika odabranih laktobacila

3.10.1. Kinetika agregacije

Autoagregacija odabranih laktobacila kao i koagregacija *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 i njegovog derivata koji nema sposobnost autoagregacije (BGSJ2-81) sa *L. innocua* ATCC33090, *E. coli* ATCC25922 i *S. enterica* ser Typhimurium TR251 su praćeni kao što je opisano u Ocaña i Nader-Macías (2002). Bakterijske kulture su dva puta oprane u PBS puferu (80 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5) i resuspendovane u istom puferu tako da sadrže približno 10^8 CFU/ml. Za praćenje autoagregacije, merena je optička gustina suspenzije bakterijskih ćelija na 600 nm (4 ml) na spektrofotometru (Ultrospec 500 pro, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Engleska), tokom 5 h na svakih sat vremena i nakon 24 h. Za koagregaciju, ćelije su resuspendovane u PBS puferu do 10^8 CFU/ml i po 2 ml suspenzije obe vrste

bakterija za koje se prati koagregacija su pomešane. A_0 označava vrednost optičke gustine na početku merenja i A_t je vrednost optičke gustine suspenzije nakon određenog vremenskog perioda. Procenat ko/autoagregacije je računat:

$$\% \text{ ko/autoagregacije} = 1 - (A_t/A_0) \times 100.$$

3.10.2. Određivanje prirode faktora koji učestvuju u agregaciji

Da bi se odredila priroda molekula koji učestvuju u agregaciji, sojevi su tretirani proteinazom K (Merck) na osnovu metode koja je ranije opisana (Schachtsiek et al., 2004). Oko 10^8 CFU/ml bakterijskih ćelija koja se testira je dva puta oprano u PBS puferu, resuspendovano u PBS puferu sa proteinazom K (1 mg/ml) i inkubirano 1 h na 37°C . Tretirane ćelije su oborene ($10000 \times g$ 2 min) i oprane dva puta PBS puferom. Kao kontrola su korišćene ćelije resuspendovane u PBS puferu netretirane proteinazom K. Autoagregacija ili koagregacija tretiranih ćelija je praćena na sobnoj temperaturi.

3.10.3. Analiza površinskih karakteristika laktobacila - adhezija za heksadekan

Adhezija za heksadekan je rađena po već opisanoj proceduri (Pelletier et al., 1997). Prekonoćne kulture testiranih sojeva su oborene u centrifugi ($2.500 \times g$, 10 min) oprane dva puta u 0,1 M KNO_3 (pH 6,2) i resuspendovane do optičke gustine 0,4 na 400 nm (A_0) u 0,1 M KNO_3 (pH 6,2). Heksadekan je korišćen kao nepolarni rastvarač i adhezija bakterijskih ćelija za ovaj rastvarač može da posluži kao merilo hidrofobnosti površine bakterija. Pomešano je 1,2 ml suspenzije bakterijskih ćelija sa 0,2 ml heksadekana i inkubirano 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga su suspenzije vorteksovane 2 min posle čega se ostave na sobnoj temperaturi da bi se potpuno odvojile faze. Nakon toga, vodena faza se odbaci i meri se optička gustina na 400 nm (A_1). Procenat adhezije za heksadekan se računa kao: $(1 - A_1/A_0) \times 100$. Eksperiment je ponovljen tri puta sa tri različite prekonoćne kulture za svaki testirani soj.

3.11. Analiza soja *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 kao potencijalnog probiotika

3.11.1. Izolacija i prečišćavanje egzopolisaharida EPS-CG11

U cilju izolaciju EPS-CG11 soj BGCG11 je gajen u bazalnom minimalnom medijumu (BMM): glukoza (20 g/l), Na-acetat (6 g/l), NH_4 -citrat (1 g/l), K_2HPO_4 (3

g/l), KH_2PO_4 (3 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/l), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,032 g/l), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,02 g/l), paraaminobenzoeva kiselina (0,2 mg/l), folna kiselina (0,1 mg/l), nikotinska kiselina (1 mg/l), pantotenska kiselina (1 mg/l), piridoksin (2 mg/l), riboflavin (1 mg/l), biotin (1 mg/l), tween 80 (1 mg/l) i CASA (Casamino acids) 20 g/l. Metoda izolacije EPS-a je rađena prema prethodno opisanoj metodi (Cerning et al., 1994), sa malim izmenama. Soj BGCG11 je zasejan u BMM medijum (10%, v/v) i inkubiran na 25°C 48 h. Posle inkubacije, bakterije su uklonjene centrifugiranjem ($12000 \times g$, 30 min, 4°C) u Sorvall centrifugi. EPS je precipitiran iz supernatanta dodatkom 2 zapremine hladnog etanola (96%) nakon čega je smešainkubirana na 4°C tokom 48 h. Precipitat je sakupljen centrifugiranjem ($12000 \times g$, 20 min, 4°C), rastvoren u destilovanoj vodi i dijalizovan (u vodi) koristeći membrane za dijalizu sa 12-14 kDa MWCO (Sigma, MO, SAD), tokom 24 h na 4°C. Dobijeni EPS je dodatno prečišćen da bi se umanjio sadržaj DNK i proteina. EPS je rastvoren u 50 mM Tris-HCl, 10 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 7,5) do konačne koncentracije of 5 mg/ml i tretiran sa DNazom tip I (Sigma, finalna koncentracija 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) tokom 6 h na 37°C, praćeno tretmanom sa pronazom E (Sigma, finalna koncentracija 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) tokom 18 h na 37°C. U cilju precipitiranja enzima i ostataka peptida dodata je TCA (12% finalno) i mešano je na sobnoj temperaturi 30 min. Posle centrifugiranja ($12000 \times g$, 20 min, 4°C), je sakupljen supernatant čija je pH podešena na 4,0-5,0 sa 10 N NaOH, i dijalizovan je (72 h , na 4°C sa promenom vode na 24 h). Nakon toga je EPS liofilizovan i korišćen za dalje analize.

EPS-GG (produkt *Lb.rhamnosus* GG) je izolovan po prethodno opisanoj metodi (Ruas-Madiedo et al., 2005). Dodatno prečišćavanje od DNK i proteina je urađeno na isti način kao i za prečišćavanje EPS-CG11.

3.11.2. Preživljavanje EPS producenta BGCG11 i njegovih derivata i stabilnost prečišćenog EPS-CG11 u simuliranim uslovima prolaska kroz gastrointestinalni trakt (GIT)

Odnos preživljavanja BGCG11 soja i njegovih Muc^- derivata (NB1, NB4 i NB16) nakon prolaska kroz simulirane uslove GIT-a je testiran po prethodno opisanoj metodi (Sánchez et al., 2010). Prekonoćne kulture (gajene u MRS medijumu) testiranih bakterija su oborene ($2050 \times g$, 15 min), oprane dva puta u 0,85% NaCl i 10 puta koncentrisane ili u 0,85% NaCl ili u 10%-nom rekonstituisanom sterilizovanom obranom mleku (BD, Difco[®], Becton Dickinson, NJ, SAD). Nakon toga suspenzije

bakterija su 10 puta razblažene u želudačnom soku [ŽS: 125 mM NaCl, 7 mM KCl, 45 mM NaHCO₃, 0,3% pepsina (Sigma) puferisan sa HCl do pH 2] i inkubirane 90 min na 37°C u aerobnim uslovima (mešanje na 200 rpm). Potom su suspenzije centrifugirane (2050 × g, 15 min) i resuspendovane u dvanaestopalačnom soku, [DS: 1% goveđe žuči (Sigma) puferisan sa 10 N NaOH do pH 8] i inkubirano dodatnih 10 min na 37°C u anaerobnim uslovima: 10% (v/v) H₂, 10% CO₂ i 80% N₂ (anaerobna komora MG500, Don Whitley Scientific, Engleska). Na kraju su oborene ćelije resuspendovane u crevnom soku [CS: 0,3% goveđe žuči, 0,1% pankreasa u prahu (“Pancreas acetone powder porcine Type I”, Sigma), pH 8] i inkubirane 120 min na 37°C u anaerobnim uslovima (kao što je prethodno navedeno). Određivanje broja preživelih bakterija je rađeno kako pre tretmana u simuliranim uslovima GIT-a (po 100 μl suspenzije), kao i nakon svake faze prolaska kroz simulirane uslove GIT-a. Tokom inkubacije u crevnom soku, uzeti su uzorci nakon 60 min i nakon 120 min. Serijska razblaženja uzoraka su pravljena u Ringerovom rastvoru (Merck) i nanošeno je po 100 μl na MRS agar. Petri šolje su inkubirane 48 h na 30°C i rezultati su predstavljeni kao CFU/ml. Izračunat je procenat preživljavanja nakon svake faze u odnosu na početni broj bakterija (% CFU tretiranih bakterija / CFU početnog broja bakterija). Eksperimenti su rađeni u triplikatu.

Simulirani prolazak kroz GIT za prečišćeni EPS je rađen po prethodno opisanoj metodi (Salazar et al., 2009). Prečišćeni EPS je resuspendovan u ultra čistoj vodi (Sigma) do koncentracije 10 mg/ml, 100 μl rastvorenog EPS-a je mešano sa 900 μl ili ŽS ili DS i inkubirano pod gore navedenim uslovima. Nakon toga, uzorci su sakupljeni i čuvani na -80°C pre nego što će se dalje analizirati. U slučaju uzoraka koji su prošli kroz ŽS, pH je prvo podešena do 4,5 ± 0,5 sa 10 N NaOH pre daljih analiza. Efekat prolaska kroz simulirane uslove GIT-a (hidroliza EPS-a) je praćen gel filtracijom (“size exclusion chromatography”) povezanom sa “multi-angle laser light scattering” (MALLS) detektorom. Sistem za hromatografiju (Waters, Milford, MA, SAD) se sastojao od “Alliance 2690 module” injektor, “Photodiode Array PDA 996” detektora (podešenog na 280 nm), detektora tip 410 sa refrakcionim indeksom (RI) i “Empower” softvera (Waters). MALLS detektor (Dawn Heleos II, Wyatt Europe GmbH, Nemačka) je serijski bio povezan sa sistemom, a softver Astra 3.5 je korišćen za analizu distribucije molarnih masa. Razdvajanje je rađeno u dve serijski povezane gel filtracione kolone, TSK-Gel G3000 PW_{XL} + TSK-Gel G5000 PW_{XL} zaštićene sa TSK-Gel kolonom (Supelco-Sigma) na 40°C, i protokom 0,1 M NaNO₃ od 0,45 ml/min. Eksperiment je ponovljen tri puta.

3.11.3. Adhezija *Lb. paraplantarum* BGCG11 i derivata za intestinalne ćelijske linije

Korišćene su tri ćelijske linije (Caco-2, HT29 i HT29-MTX) sa kojima je praćena adhezija BGCG11 i Muc⁻ derivata (NB1, NB4 i NB16). Kao referentni soj u ovom eksperimentu korišćen je *Lb. rhamnosus* GG. Caco-2 i HT29 ćelijske linije su poreklom iz Evropske kolekcije kulture ćelija (ECACC No. 86010202 i 91072201, redom) a HT29-MTX ćelijska linija je dobijena od Dr. T. Lesuffleur (Lesuffleur et al., 1990). Kultivacija i održavanje ćelijske linije je raćeno po standardizovanoj proceduri kao što je prethodno opisano (Sánchez et al., 2010). Za gajenje ćelija su korišćeni sledeći medijumi: DMEM za Caco-2 i HT29-MTX ćelijske linije, i McCoy's medium za HT29. U medijum je dodat 10% goveđi fetalni serum (Sigma) i mešavina antibiotika (Sigma): 50 µg/ml penicilin, 50 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamicin i 1,25 µg/ml amfotericin B. Intestinalne ćelije su zasejane u ploče sa 24 bunara. Za eksperimente adhezije, ćelije su korišćene u stadijumu kad dostignu konfluentnost (13±1 dana) u stanju jednoslojnog epitela.

Za testiranje adhezije, laktobacili su gajeni 24 h u MRS medijumu i nakon dva pranja u Dulbecco's PBS puferu (Sigma), resuspendovani su u odgovarajućem medijumu za ćelijske linije bez antibiotika do koncentracije oko 10⁸ CFU/ml. Ćelijske linije su pažljivo oprane i bakterijske suspenzije su dodate u odnosu 10:1 (bakterija: eukariotska ćelija). Testiranje adhezije je raćeno tokom jednog sata na 37°C, 5% CO₂ (Heracell® 240 inkubator). Nakon interakcije, bunari ploča su pažljivo oprani da bi se oslobodile nevezane bakterijske ćelije, nakon čega su eukariotske ćelije sa vezanim bakterijama podvrgavane tretmanu sa 0,25% Trypsin-EDTA rastvorom (Sigma) da bi se narušio jednoslojan epitel. Uzimani su uzorci (100 µl) za izraćunavanje CFU/ml broja bakterija pre i posle adhezije, razblaženja su pravljena u Ringerovom rastvoru i naneta na MRS čvrste podloge. Procenat adhezije je raćunat kao: % CFU/ml vezanih bakterija / CFU/ml dodatih bakterija. Eksperimenti su raćeni na dve nezavisne ploče sa bunarima u duplikatu za svaku ćelijsku liniju.

3.11.4. Proliferacija i produkcija citokina u leukocitima iz periferne krvi (LPK) u prisustvu mrtvih bakterija ili prečišćenog EPS-CG11

Humani leukociti periferne krvi (LPK) su dobijeni iz krvi dobrovoljnih davaoca (Centar za transfuziju krvi u Asturiji, Ovijedo, Španija) nakon odobrenja Regionalnog etičkog komiteta za klinička istraživanja (Asturija, Španija). LPK su izolovane centrifugiranjem u gradijentu Histopaque-1077 (Sigma) iz šest zdravih donora. LPK su gajene u RPMI-1640 kompletnom medijumu: 2 mM L-glutaminom, 25 mM HEPES (PAA, Pašing, Austrija), 10% (v/v) temperaturno inaktiviranim fetalnim goveđim serumom (PAA), streptomycinom i ampicilinom (100 µg/ml).

Odgovor LPK na mrtve ćelije laktobacila (UV-zračenjem 90 min, sa blagim mućkanjem svakih 30 min) kao i na različite koncentracije (1, 10 i 100 µg/ml) EPS-CG11 je praćen po prethodno opisanoj metodi (López et al., 2010). U 200 µl RPMI medijuma je koinkubirano 2×10^4 LPK sa bakterijama u odnosu 1:5 (LPK : bakterija) ili sa EPS-CG11 tokom 4 dana na 37°C, 5% CO₂. LPK, gajene samo u kompletnom RPMI medijumu ili u prisustvu 50 ng/ml lipopolisaharida (LPS) iz *E. coli* 0111:B4 (Sigma), su korišćeni kao negativna (RPMI) i kao pozitivna kontrola (RPMI + LPS) eksperimenta. Svi testovi i kontrole su analizirani u triplikatu, koristeći ploče sa 96 bunara sa okruglim dnom (Costar, Kembridz, MA, SAD). Nakon 4 dana inkubacije, iz svakog bunara je uzeto 20 µl supernatanta i sačuvano na -20°C pre analize produkcije citokina. U cilju merenja proliferacije LPK, 20 µl kompletnog RPMI medijuma koji je sadržao 10 µM (finalna koncentracija) BrdU (GE Healthcare Ltd., Bukinghemšajer, Engleska) je dodata i inkubacija je nastavljena još 18 h. Nakon toga ćelije su staložene centrifugiranjem, fiksirane i njihova proliferacija je određena korišćenjem "Amersham Cell Proliferation Biotrack ELISA" sistema (GE Healthcare Ltd.) na osnovu uputstva proizvođača. Reakcija je praćena merenjem optičke gustine na 450 nm u "Modulus Microplate" fotometru (Turner Biosystems, CA, SAD) i indeks proliferacije (IP) dobijen za svaki stimulus je računat u odnosu na negativnu kontrolu (IP negativne kontrole = 1).

Produkcija citokina LPK je kvantifikovana multipleks imuno-esejem Flex Set za "Cytometric Bead Array" (CBA) uključujući IFN γ , TNF α , IL-12, IL-10, IL-1 β i IL-17 (Becton Dickinson, BD Biosciences, San Dijego, CA, SAD). "FacsCantoII" protočni citometar i "FCAP array" softver (BD Biosciences) su korišćeni u analizi. Limiti

detekcije su bili: 0,8 pg/ml (IFN γ), 3,7 pg/ml (TNF α), 1,9 pg/ml (IL-12p70), 3,3 pg/ml (IL-10), 7,2 pg/ml (IL-1 β) i 0,3 pg/ml (IL-17).

3.11.5. Adhezija patogenih sojeva za HT29-MTX i praćenje efekta koinkubacije patogena sa sojem BGCG11, derivatom NB1 i sojem *Lb. rhamnosus* GG ili sa EPS molekulima

Lb. paraplantarum BGCG11 i odabrani Muc⁻ derivat NB1 su bili uključeni u detaljniju analizu potencijalnog pozitivnog efekta na HT29-MTX ćelijsku liniju u prisustvu različitih patogena (*Cl. difficile* LMG21717, *S. enterica* ser. Typhimurium LMG15860, *L. monocytogenes* LMG13305, *Cr. skrancenica sakazakii* LMG5740, *E. coli* LMG2092, *Sh. sonnei* LMG10473 i *Y. enterocolitica* LMG7899). Bakterijski sojevi su gajeni 24 h u svojim optimalnim uslovima rasta, oprani su dva puta u PBS puferu (NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,15g/l, KH₂PO₄ 0,2 g/l; pH 7,5) i resuspendovani su u Dulbecco's PBS puferu ili DMEM medijumu bez antibiotika, do koncentracije od oko 10⁸ CFU/ml. Jednoslojni epitel HT29-MTX ćelijske linije je pažljivo opran Dulbecco's PBS puferom (Sigma) i dodate su bakterije u odnosu 10:1 (bakterija: eukariotska ćelija). su Svaki laktobacil (BGCG11, Muc⁻ derivat NB1 i *Lb. rhamnosus* GG kao pozitivna kontrola), patogen (*Cl. difficile* LMG21717, *S. enterica* ser. Typhimurium LMG15860, *L. monocytogenes* LMG13305, *Cr. sakazakii* LMG5740, *E. coli* LMG2092, *Sh. sonnei* LMG10473 i *Y. enterocolitica* LMG7899), EPS-CG11 (1 mg/ml), kao i EPS-GG (1 mg/ml) su ponaosob inkubirani sa HT29-MTX ćelijama tokom 3 h pod uslovima optimalnim za ovu ćelijsku liniju (37°C, 5% CO₂ u Heracell® 240 inkubatoru). Zatim je sa HT29-MTX rađena koinkubacija laktobacila posebno sa svakim patogenom, u odnosu 1:1, kao i koinkubacija posebno EPS-CG11 i posebno EPS-GG sa patogenim sojevima (1 mg/ml) pod istim gore navedenim uslovima. Nakon koinkubacije od 3 h, praćen je efekat interakcija na HT29-MTX ćelijskoj liniji: citotoksičnost i nivo produkcije IL-8.

3.11.5.1. Citotoksični efekat patogenih bakterija na HT29-MTX

Nakon inkubacije HT29-MTX sa bakterijama i EPS polimerima kao što je predhodno navedeno supernatant koji je sadržao bakterije je centrifugiran (16000 × g, 10 min, RT) da bi se odstranile bakterije. Takav supernatant je korišćen za merenje citotoksičnog

efekta u vidu stepena lize eukariotskih ćelija. Merenje citotoksičnog efekta je rađeno merenjem nivoa aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) oštećenih ćelija. Korišćen je “Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH)” (Roche, Manhajm, Nemačka) i praćen je postupak po uputstvu proizvođača. Razlike u nivou oštećenja ćelija su praćena merenjem optičke gustine na 450 nm u Modulus Microplate fotometru. Nivo citotoksičnog efekta je predstavljen kao relativna vrednost u odnosu na netretirane ćelije (HT29-MTX inkubirane u Dulbecco’s PBS puferu): dobijena vrednost tretiranih ćelija / vrednost netretiranih ćelija. Svi eksperimenti su ponovljeni tri ili više puta.

3.11.5.2. Merenje produkcije IL-8 u HT29-MTX ćelijskoj liniji nakon interakcije sa bakterijama ili EPS polimerima

Produkcija IL-8 u tretiranim HT29-MTX ćelijama je merena u supernatantu dobijenom taloženjem HT29-MTX ćelija inkubiranih u DMEM medijumu sa različitim bakterijama ili EPS polimerima kao što je predhodno navedeno. Kao i za merenje citotoksičnog efekta, supernatant je prvo oslobođen od bakterija centrifugiranjem (16000 × g, 10 min, RT), a potom je pomoću ELISA kita (“Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go![®]” kit, eBioscience, CA, SAD) merene nivo sinteze IL-8, prema uputstvu proizvođača. Vrednost produkcije IL-8 je izražena u odnosu na negativnu kontrolu (HT29-MTX inkubirane samo u DMEM medijumu): dobijena vrednost tretiranih ćelija / vrednost netretiranih ćelija. Eksperimenti su rađeni u duplikatu, sa uzorcima koji su dobijeni posle inkubacije sa HT29-MTX ćelijskom linijom različitih pasaža (p20 do p23).

3.11.6. Statistička analiza

Za statističku obradu podataka je korišćen SPSS 15.0 softver (SPSS Inc., IL, SAD).

4. REZULTATI

U ovom radu su izučavane površinske karakteristike laktobacila izolovanih iz autohtonih sireva u cilju analize probiotskog potencijala prirodnih izolata. Odabrani su različiti sojevi laktobacila koji ispoljavaju osobinu autoagregacije i jedan soj koji sintetiše egzopolisaharide jer su pomenute osobine bitne za interakciju bakterijskih ćelija sa okolnom sredinom. U cilju analiziranja autoagregacije različitih izolata korišćeni su testovi kojima su određivane karakteristike autoagregacije kao i testovi kojima se pokazuje priroda molekula koji učestvuju u formiranju agregata. EPS producent je detaljnije analiziran *in vitro* testovima preživljavanja uslova u GIT-u, adhezije za intestinalne ćelijske linije i modulacije imunog odgovora limfocita ili epitelijalnih ćelija. Na kraju, lokalizovan je i opisan potencijalni EPS operon što je upotpunilo karakterizaciju samog EPS producenta i dalo svojevrsan doprinos analizi površinskih karakteristika.

4.1. Identifikacija izolata i derivata korišćenih u radu

Odabrani prirodni izolati laktobacila koji autoagregiraju (BGAR75, BGGR2-68, BGGR2-82, BGDP9-85, BGDP1-84, BGNJ1-3, BGNJ1-61, BGNJ1-70, BGDU4-71), kao i dva izolata (BGAR76 i BGGR2-20), koji ne agregiraju, su determinisani na osnovu homologije dela sekvence gena za 16S rRNK. Poređenjem dobijenih sekvenci PCR produkata (umnoženih pomoću prajmera UNI16SF i UNI16SR, veličine 1,6 kb) sa sekvencama iz NCBI baze podataka, utvrđeno je da svi izolati, osim izolata BGDU4-71, pripadaju *Lactobacillus casei* grupi (Tabela 2, Materijal i metode). Izolat BGDU4-71 je na isti način determinisan kao *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* BGSJ2-8 (Agg⁺) i njegov Agg⁻ derivat (BGSJ2-81) koji spontano gubi sposobnost autoagregacije (nakon kultivisanja bakterije sa -80°C na 30°C) su uključeni u detaljniju analizu osobine autoagregacije. Bakterijske kolonije Agg⁻ derivata BGSJ2-81 imaju drugačiju morfologiju (pljosnate i providne), u odnosu na okruglaste mlečno-bele kolonije Agg⁺ parentalnog soja BGSJ2-8 (Lozo et al., 2007).

Soj BGCG11, producent visokomolekularnog EPS-a (EPS-CG11) je predhodno bio determinisan kao *Lactobacillus casei* na osnovu fermentacije šećera i G+C sastava (Kojic et al., 1992). Detaljnijom determinacijom koristeći tehnike molekularne genetike soj je na osnovu dela sekvence gena za 16S rRNK svrstan u grupu *Lactobacillus plantarum/penthosus* (99% identičnosti, prijavljena sekvenca u EMBL bazu podataka pod brojem HE600693). Konačna determinacija do nivoa vrste je urađena AFLP metodom u Laboratoriji za mikrobiologiju, Univerziteta u Gentu ("Laboratory for Microbiology of Ghent University"), Gent, Belgija, na osnovu čega je soj BGCG11 determinisan kao *Lactobacillus paraplantarum*. Muc⁻ derivati (NB1, NB4 i NB16) soja BGCG11 su dobijeni čišćenjem plazmida tretmanom novobiocinom. Morfologija kolonija Muc⁻ derivata se razlikuje od parentalnog soja po tome što kolonije nisu okruglaste sa definisanim ivicama, najverovatnije usled gubitka sposobnosti produkcije EPS-CG11.

4.2. Autoagregacija izabranih sojeva laktobacila

U laboratorijskoj kolekciji laktobacila izolovanih iz različitih fermentisanih mlečnih proizvoda poreklom iz Srbije identifikovan je veći broj izolata laktobacila koji ispoljavaju osobinu autoagregacije. Cilj ovog rada je bio karakterizacija prirode faktora koji utiču na sposobnost autoagregacije izabranih sojeva laktobacila *Lb. casei* grupe.

Radi poređenja brzine i tipa autoagregacije, praćena je autoagregacija sojeva u PBS puferu tokom 24 h, merenjem apsorbance na 600 nm i preračunavanjem procenta agregiranih ćelija u odnosu na početnu optičku gustinu bakterijskih suspenzija (Tabela 4.). Sojevi BGSJ2-8, BGDP1-84 i BGNJ1-6 su pokazali najbržu autoagregaciju. Njihovi agregati su imali izgled pahuljica, koje se najbrže (brže od 5 minuta) stalože na dno epruvete i ostave vizuelno čist i potpuno providan medijum iznad svojih agregata. Ostali sojevi su sporije agregirali (za formiranje agregate im je bilo potrebno 15 min i duže). Agregati ćelija sojeva BGAR75, BGDP9-85 i BGNJ1-45 su bili sitniji, kao prašina ili sitne pahuljice. Nakon 24 h na sobnoj temperaturi svi sojevi koji autoagregiraju su imali najmanje 50% ćelija u agregatima.

Tabela 4. Autoagregacija sojeva u PBS puferu, praćena tokom 24 h. Zatamnjeni su sojevi sa najbržom sposobnošću autoagregacije. Prikazane su prosečne vrednosti tri nezavisna eksperimenta sa standardnom devijacijom.

Soj	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	24 h
BGSJ2-8	74.62 ± 3.21	82.93 ± 2.95	85.15 ± 1.54	86.99 ± 1.52	89.79 ± 4.27	98.83 ± 0.97
BGAR75	6.86 ± 6.39	14.91 ± 0.19	15.74 ± 3.25	18.92 ± 2.52	23.12 ± 4.62	61.26 ± 1.37
BGGR2-68	16.84 ± 10.44	34.52 ± 2.61	42.10 ± 0.87	49.69 ± 1.05	51.81 ± 2.64	84.52 ± 0.24
BGGR2-82	14.68 ± 3.07	23.38 ± 5.13	29.07 ± 8.83	33.18 ± 4.42	37.82 ± 7.85	57.36 ± 6.85
BGDP1-84	73.62 ± 9.31	82.63 ± 7.20	85.54 ± 4.86	88.08 ± 4.45	89.07 ± 2.52	90.80 ± 0.98
BGDP9-85	5.93 ± 0.08	9.74 ± 1.96	13.95 ± 0.37	17.92 ± 2.69	19.70 ± 0.54	53.61 ± 4.1
BGNJ1-3	21.49 ± 19.31	31.86 ± 15.68	35.26 ± 20.49	40.53 ± 22.49	41.65 ± 19.68	68.40 ± 11.43
BGNJ1-61	78.16 ± 2.60	81.63 ± 3.70	83.61 ± 2.67	85.16 ± 2.43	85.71 ± 2.70	95.36 ± 0.15
BGNJ1-70	54.41 ± 31.19	59.52 ± 24.65	67.99 ± 22.68	69.69 ± 22.69	72.25 ± 19.93	88.43 ± 7.04
BGDU4-71	26.33 ± 8.15	38.87 ± 7.48	44.08 ± 6.09	48.37 ± 8.47	50.54 ± 9.97	73.63 ± 7.57

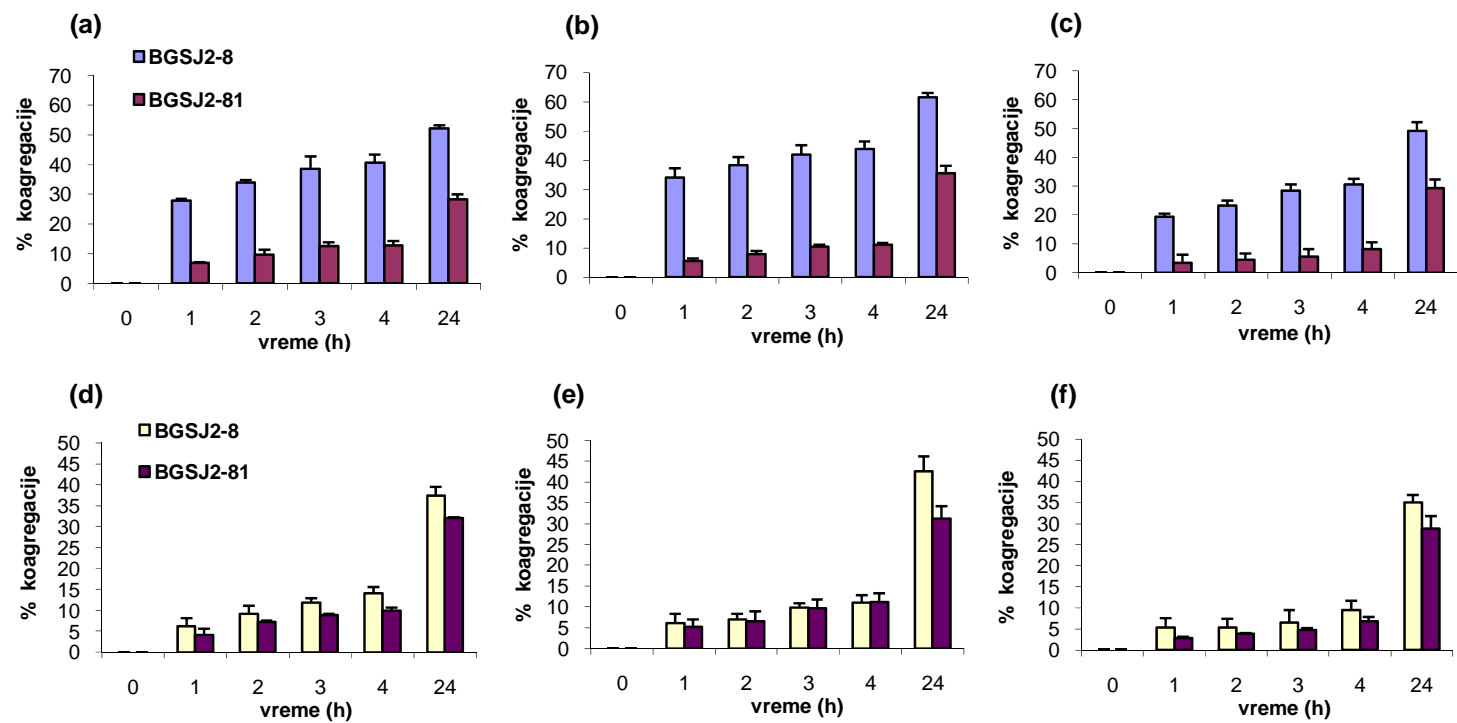
4.2.1. Karakterizacija prirode faktora koji utiču na sposobnost autoagregacije izabranih sojeva laktobacila

Da bi se pokazalo da li prisustvo jona (PBS pufer) ili njihovo odsustvo (bidestilovana voda) ima uticaj na interakciju bakterijskih ćelija, vršeno je pranje bakterijskih ćelija sojeva koji autoagregiraju. Intenzivno pranje ćelija u PBS puferu nije dovelo do gubitka autoagregacije. Pranje ćelija u bidestilovanoj vodi je dovelo do skoro potpunog gubitka autoagregacije, što znači da je prisustvo jona neophodno da bi se uspostavila interakcija. Jedino soj BGDP1-84 zadržava autoagregaciju i nakon intenzivnog pranja u bidestilovanoj vodi.

Da bi se proverilo da li su faktori agregacije proteinske prirode, sojevi su tretirani proteinazom K. Nakon ovog tretmana je primećeno da se vidno smanjila ili potpuno izgubila sposobnost autoagregacije kod svih sojeva, što je ukazalo na proteinsku prirodu faktora koji izaziva autoagregaciju.

4.2.2. Karakterizacija prirode faktora koji utiču na sposobnost koagregacije soja *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 sa drugim vrstama bakterija

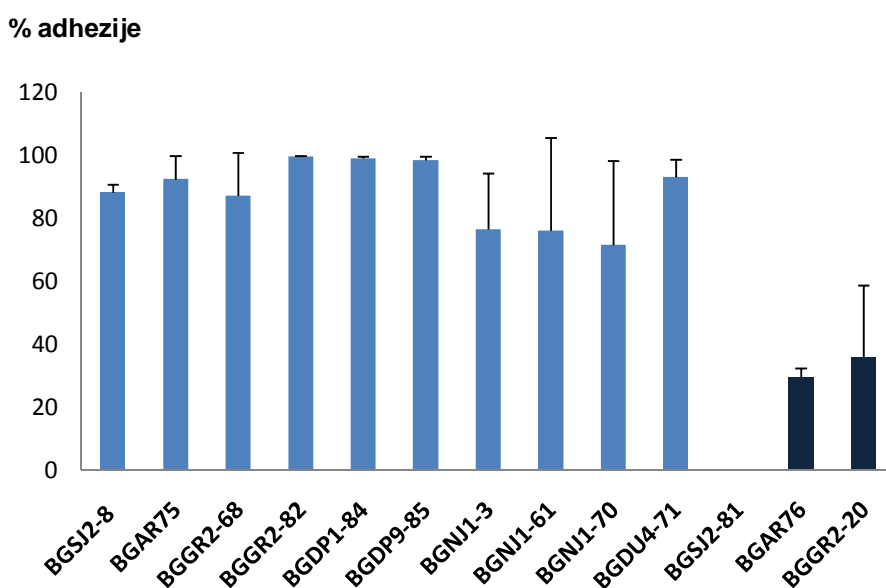
U cilju karakterizacije faktora koji utiču na sposobnost koagregacije analizirana je sposobnost formiranja koagregata soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 i njegovog Agg⁻ derivata BGSJ2-81 sa bakterijama vrsta *Listeria innocua* ATCC33090, *Escherichia coli* ATCC25922 ili *Salmonella enterica* ser. Typhimurium TR251. Koagregacija je rađena sa bakterijskim suspenzijama u PBS puferu, pri odnosu bakterija 1:1, gde je u svakoj suspenziji bilo 10⁸ CFU/ml bakterija. Koagregacija je praćena tokom 24 h, merenjem apsorbanace na 600 nm, nakon čega je izračunat procenat koagregirajućih ćelija u odnosu na početnu optičku gustinu bakterijskih suspenzija. Najviši stepen koagregacije soja BGSJ2-8 je zabeležen sa *E. coli* ATCC25922, dok je najmanji bio sa *S. enterica* ser. Typhimurium TR251. Agg⁻ derivat BGSJ2-81, nije formirao koagregate (Slika 2.). Nakon tretmana BGSJ2-8 proteinazom K koagregacija se drastično smanjila u odnosu na netretirane ćelije (Slika 2.). Može se zaključiti da je i za koagregaciju neophodna određena proteinska komponenta sa površine bakterijskih ćelija. Paralelno, tretirane su ćelije *L. innocua* ATCC33090, *E. coli* ATCC25922 ili *S. enterica* ser. Typhimurium TR251 proteinazom K i praćena je koagregacija sa netretiranim ćelijama laktobacila. Rezultati su pokazali da je procenat koagregacije smanjen, ali je taj efekat značajno manji nego kada se proteinazom K tretiraju ćelije laktobacila neposredno pre koagregacije (nije data slika). Može se zaključiti da je interakcija BGSJ2-8 sa *L. innocua* ATCC33090, *E. coli* ATCC25922 ili *S. enterica* ser. Typhimurium TR251 zavisna od proteina na površini bakterija, i to u većoj meri od proteina na površini ćelija laktobacila.



Slika 2. Koagregacija BGSJ2-8 i njegovog Agg⁻ derivata BGSJ2-81 sa *L. innocua* ATCC33090 (a), *E. coli* ATCC25922 (b) i *S. enterica* ser. Typhimurium TR251 (c), i praćenje ove interakcije posle tretmana ćelija laktobacila proteinazom K: koagregacija sa *L. innocua* ATCC33090 (d), *E. coli* ATCC25922 (e) i *S. enterica* ser. Typhimurium TR251 (f). Prikazane su srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta sa strandarnim devijacijama.

4.2.3. Analiza površinskih osobina odabranih sojeva laktobacila - adhezija za heksadekan

U cilju karakterizacije površinskih karakteristika sojeva koji su ispoljili sposobnost autoagregacije merena je hidrofobnost površine ćelija pomenutih sojeva. Osim toga analizirani su i sojevi koji nemaju sposobnost autoagregacije (BGAR76, BGGR2-20 i derivat BGSJ2-81) u cilju međusobnog poređenja. Za merenje hidrofobnosti površine laktobacila korišćen je heksadekan kao nepolarni rastvarač. Agregirajući sojevi ispoljavaju visoki procenat adhezije za heksadekan (preko 60%) u odnosu na neagregirajuće (do 29%). Posebno se ističe razlika od 88% u adheziji BGSJ2-8 i njegovog neagregirajućeg derivata BGSJ2-81 (Slika 3.).



Slika 3. Procenat adhezije za heksadekan sojeva koji autoagregiraju (sveto plava boja) u odnosu na sojeve koji nemaju sposobnost autoagregacije (tamno plava boja).

Iz predstavljenih rezultata se jasno uočava da sojevi koji autoagregiraju imaju izuzetno hidrofobnu površinu bakterijskih ćelija.

4.3. Analiza soja *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11, producenta EPS-CG11 kao potencijalnog probiotika

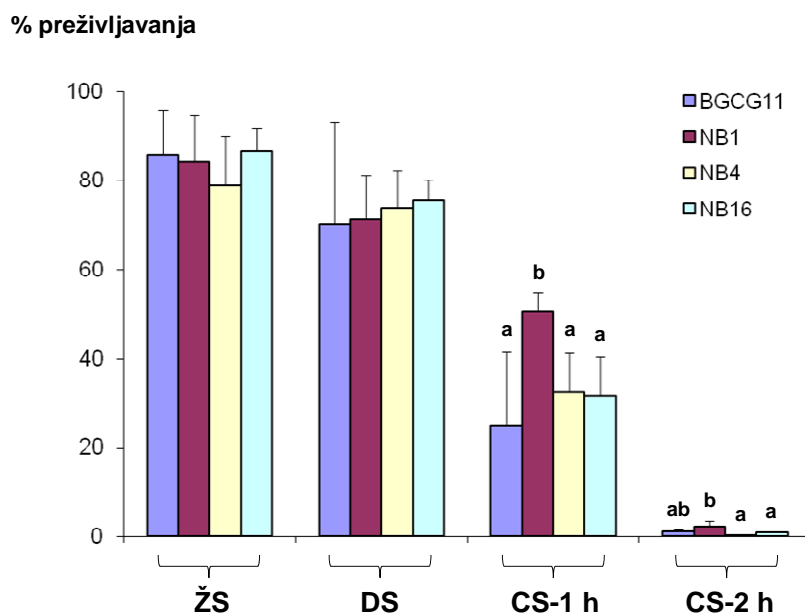
BGCG11 produkuje egzopolisharid EPS-CG11, zahvaljujući kome se menja morfologija kolonija. Kolonije postaju rastegljive, tj. formira se filament od bakterijskih ćelija u matriksu EPS-a. Muc⁻ derivati NB1, NB4 i NB16 koji su dobijeni čišćenjem plazmida tretmanom novobiocinom su izgubili rastegljiv karakter i ne produkuju EPS-CG11. Prethodni rezultati su pokazali da derivat NB1 produkuje rezidualni EPS u znatno manjoj količini od parentalnog soja BGCG11 i koji je različitog sastava od EPS-CG11 (Cerning et al., 1994). S obzirom da je poznato da EPS molekuli mogu da imaju imunomodulatorni efekat cilj ovog rada je bila analiza probiotičkih osobina soja *Lb. paraplantarum* BGCG11 i Muc⁻ derivata koji ne produkuju EPS-CG11.

4.3.1. Preživljavanje EPS producenta BGCG11 i Muc⁻ derivata NB1, NB4, NB16 koji su izgubili rastegljiv fenotip pod simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta (GIT)

Osnovni kriterijum za selekciju probiotika jeste sposobnost preživljavanja rigoroznih uslova koji vladaju u GIT-u, kao i da pokazuju pozitivan efekat na zdravlje ljudi. U ovom radu je testirana sposobnost soja BGCG11 i njegovih Muc⁻ derivata NB1, NB4 i NB16 preživljavanja u simuliranim uslovima GIT-a. Preživljavanje je rađeno kao simulacija prolaska bakterijske suspenzije (u 0,85% NaCl ili u 10% obranom mleku) kroz želudac i tanko crevo. Korišćeni želudačni sok je sadržao pepsin (0,3%) u uslovima niske pH vrednosti (pH 2). Nakon inkubacije u želudačnom soku u trajanju od 90 min na 37°C u aerobnim uslovima, bakterijske suspenzije su podvrgnute simuliranim uslovima prolaska kroz dvanestopalačno crevo (1% govede žuči, pH 8, 10 min na 37°C u anerobnim uslovima). Dalje su inkubirane u crevnom soku: 0,3% govede žuči, 0,1% pankreasa u prahu, pH 8, tokom 2 h na 37°C. Određen je broj CFU/ml pre tretmana prolaska kroz simulirane uslove GIT-a, kao i posle svake navedene faze, a u crevnom soku je mereno

preživljavanje nakon 1 h i nakon 2 h. Preživljavanje je predstavljeno kao procenat ćelija gde je 100% početni broj CFU/ml.

Nakon inkubacije bakterijskih suspenzija u 0,85% NaCl u želudačnom soku, uočeno je da nema preživljavanja, tako da je zaključeno da soj BGCG11 i derivati nisu u mogućnosti da prežive prolaz kroz želudačni sok. Međutim, preživljavanje bakterija u suspenzijama sa mlekom nakon inkubacije u želudačnom soku (ŽS) je bilo 80%, a izlaganje visokoj koncentraciji žučnih soli (1% žučnih soli u soku iz dvanaestopalačnog creva) je dodatno smanjilo preživljavanje za samo 10%, odnosno može se reći da je oko 70% bakterija preživelo inkubaciju u simuliranim uslovima želuca i dvanaestopalačnog creva. Produžena inkubacija u crevnom soku sa nižom koncentracijom žučnih soli i pankreasnim enzimima je drastično smanjila preživljavanje. Na kraju je preživljavanje variralo između 1 do 2% (10^6 do 10^7 CFU/ml), pri čemu je najbolje preživljavao derivat NB1. Procenti preživljavanja su prikazani na Slici 4.



Slika 4. Preživljavanje bakterijskih suspenzija BGCG11 i Muc⁻ derivata (NB1, NB4 i NB16) u 10% obranom mleku. Simulirani prolazak kroz GIT se sastojao od ŽS (želudačni sok), DS (sok iz dvanaestopalačnog creva), CS (crevni sok, CS-1 h je nakon 1 h, a CS-2 h je nakon 2 h inkubacije). Svaki stubić koji ne deli isto slovo (**a** ili **b**) je statistički međusobno različit ($p < 0,05$).

4.3.2. Stabilnost prečišćenog EPS-CG11 u uslovima simuliranog prolaska kroz GIT

EPS-CG11 je izolovan iz supernatanta tečne kulture gajene u BMM sa glukozom (Materijal i metode, poglavlje 3.11.1.). Precipitacija EPS-a je vršena hladnim etanolom . Da bi se umanjio sadržaj proteina i DNK, EPS je dodatno tretiran DNazom i pronazom E. Tako dobijeni prečišćeni EPS-CG11 je liofilizovan, a sadržao je finalno 1% DNK i 2% proteina.

Da bi se testirao uticaj simuliranog prolaska kroz GIT na fizičko-hemijska svojstva EPS-CG11, prečišćeni EPS je podvrgnut tretmanu inkubacije u želudačnom soku i soku dvanaestopalačnog creva (Tabela 5.). Nakon tretmana, urađena je HPLC analiza korišćenjem MALLS detektora da se uporedi količina i molarna masa EPS-CG11 pre i posle tretmana. Rezultati su pokazali da se ova dva parametra nisu značajno promenila nakon tretmana, što ukazuje na to da EPS-CG11 ostaje stabilan nakon prolaska kroz GIT (Tabela 5.).

Tabela 5. Stabilnost EPS-CG11 pod simuliranim uslovima prolaska kroz GIT. Nema statističke razlike u promenama početne količine i molarne mase EPS-CG11 u odnosu na tretiran EPS-CG11.

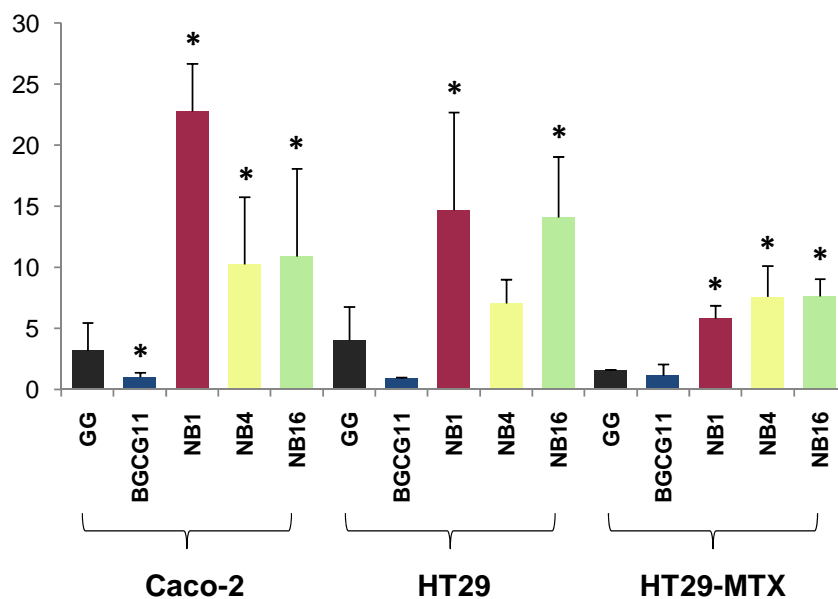
	GIT digestija	Srednja vrednost ± SD
Količina (μg)	Početna	26,2 ± 0,3
	Želudačni sok	28,5 ± 0,7
	Crevni sok	25,7 ± 0,7
Molarna masa (× 10⁶ Da)	Početna	2,2 ± 0,6
	Želudačni sok	2,3 ± 0,3
	Crevni sok	2,3 ± 0,8

4.3.3. Adhezija BGCG11 soja i derivata NB1, NB4 i NB16 za epitelijalne intestinalne ćelijske linije

Da bi probiotik ispoljio svoje pozitivno dejstvo na organizam, trebalo bi nakon preživljavanja uslova koji vladaju u GIT-u da bude u stanju da interaguje sa mukusom ili epitelijalnim ćelijama kako bi doveo do specifičnog odgovora domaćina na njegovo prisustvo. Kao sistem za *in vitro* analizu bakterijske adhezije za eukariotske ćelije GIT-a, korišćene su tri različite epitelijalne intestinalne ćelijske linije (Caco-2, HT29 i HT29-MTX), poreklom iz ćelija debelog creva. HT29-MTX ćelijska linija za razliku od druge dve ima peharaste ćelije koje omogućavaju veliku produkciju mucina.

U cilju analize uloge EPS-CG11 u adheziji za epitelijalne intestinalne ćelije praćen je procenat adhezije soja BGCG11 i Muc⁻ derivata na različite ćelijske linije. Kao kontrola je korišćen dobro okarakterisan probiotički soj sa potvrđenim svojstvom vezivanja za intestinalnu mukozu *Lb. rhamnosus* GG (Laparra and Sanz 2009; Vesterlund et al., 2005). Kada se posmatra adhezija soja BGCG11 i njegovih derivata za ćelijske linije, vidi se da generalno postoji veći procenat adheriranih ćelija Muc⁻ derivata u odnosu na parentalni soj BGCG11. Adhezija za HT29-MTX je manja u odnosu na ostale dve ćelijske linije, što može biti uticaj prisustva mucina koji ova ćelijska linija produkuje (Slika 5.). Muc⁻ derivati su se statistički značajno više ($p < 0,05$) vezivali za sve tri ćelijske linije u odnosu na soj GG (procenti adhezije od 5% do 25%). BGCG11 je pokazao slične procenat adhezije kao soj GG (na HT29 i HT29-MTX ćelijsku liniju), dok se nešto slabije vezivao za Caco-2 ćelije ($p < 0,05$).

% adhezije



Slika 5. Adhezija na humane epitelijalne intestinalne ćelijske linije Caco-2, HT29 i HT29-MTX za BGCG11 i Muc⁻ derivata NB1, NB4 i NB16, kao i za *Lb. rhamnosus* GG (kontrolni soj). U okviru svake ćelijske linije, stubići sa zvezdicom pokazuju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolni soj.

4.3.4. *In vitro* odgovor limfocita iz periferne krvi u prisustvu BGCG11, Muc⁻ derivata i prečišćenog EPS-CG11

U cilju praćenja efekta koji mogu da izazovu površinski molekuli (prvenstveno EPS) soja BGCG11 i Muc⁻ derivata izolovani su limfociti iz periferne krvi šest zdravih donora. Uticaj bakterija i EPS-a je meren nakon četiri dana inkubacije sa limfocitima. Kao stimulusi za proliferaciju i praćenje produkcije različitih citokina, korišćene su mrtve bakterijske ćelije (ubijene UV zračenjem), prečišćeni EPS-CG11 u različitim koncentracijama i komercijalni LPS *E. coli* 0111:B4 kao pozitivna kontrola. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na negativnu kontrolu (limfociti inkubirani samo u RPMI medijumu).

4.3.4.1. Proliferacija limfocita iz periferne krvi u prisustvu BGCG11, Muc⁻ derivata i prečišćenog EPS-CG11

Praćen je efekat mrtvih ćelija soja BGCG11 i Muc⁻ derivata NB1, NB4 i NB16 koji ne ispoljavaju rastegljiv fenotip, kao i prečišćenog EPS-CG11 u različitim koncentracijama (1, 10 and 100 µg/ml) na proliferaciju limfocita iz periferne krvi. Pored pomentih stimulusa, LPS iz *E. coli* 0111:B4 (0,05 µg/ml) je korišćen kao pozitivna kontrola proliferacije limfocita. Merenje proliferacije se sastojalo u merenju nivoa inkorporisanog BrdU (5-bromo-2'-deoksiuridina) u DNK molekulima proliferisanih ćelija ("Amersham Cell Proliferation Biotrack ELISA", GE Healthcare). Na osnovu merenja apsorbance (450 nm) suspenzija sa limfocitima koja predstavlja direktan nivo inkorporiranja BrdU u ćelijama limfocita, izračunat je indeks proliferacije (**IP**), koji je predstavljen kao relativna vrednost u odnosu na negativnu kontrolu (limfociti u RPMI medijumu bez stimulusa). Indeks proliferacije je prikazan kao srednja vrednost iz svih šest zdravih donora (Tabela 6.). Dobijeni rezultati su pokazali da sve ćelije laktobacila statistički značajno ($p < 0,05$) povećavaju proliferaciju limfocita u odnosu na negativnu kontrolu. Interesantno je da ni LPS (0,05 µg/ml) ni EPS-CG11 nisu modifikovali proliferaciju limfocita, ni pri maksimalnoj korišćenoj koncentraciji od 100 µg/ml. Rezultati ukazuju da verovatno neki drugi molekuli sa površine ćelija laktobacila utiču na proliferaciju limfocita.

Tabela 6. Indeks proliferacije (IP) limfocita iz periferne krvi izolovane iz šest zdravih donora, nakon inkubacije od četiri dana sa BGCG11 i Muc⁻ derivatima NB1, NB4 i NB16 kao i sa prečišćenim EPS-CG11 u različitim koncentracijama (1, 10 i 100 µg/ml) ili sa LPS *E. coli* (0,05 µg/ml). Negativna kontrola su bili inkubirani limfociti u RPMI medijumu bez stimulusa (IP=1). Zvezdice ukazuju na nivo statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

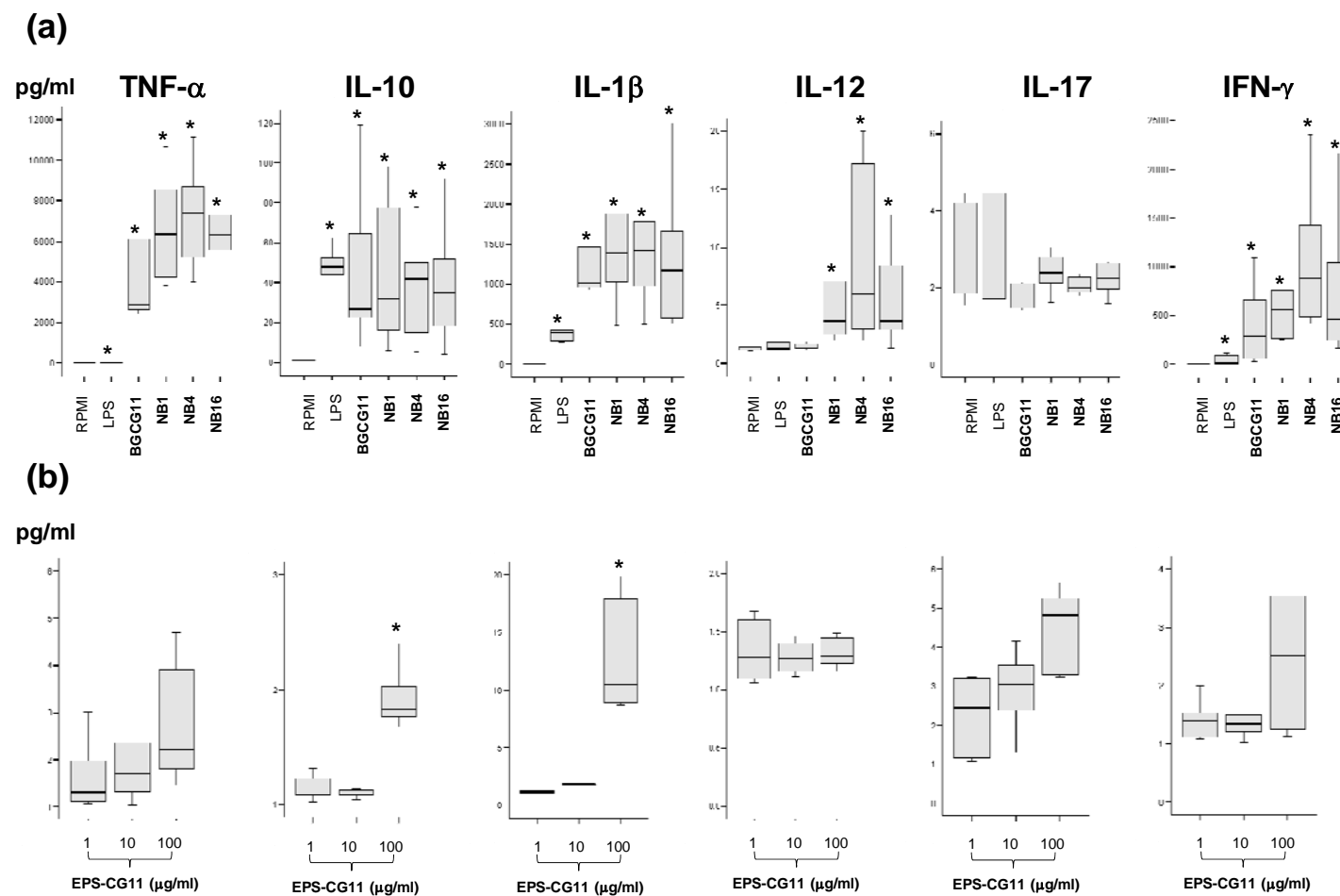
		IP
Stimulus		Srednja vrednost ± SD
LPS <i>E. coli</i>	0,05 µg/ml	0,96 ± 0,30
<i>Lb. paraplantarum</i>	BGCG11	1,12 ± 0,16 **
	NB1	1,14 ± 0,28 *
	NB4	1,23 ± 0,17 ***
	NB16	1,23 ± 0,18 ***
EPS-CG11	1 µg/ml	1,04 ± 0,15
	10 µg/ml	1,00 ± 0,15
	100 µg/ml	1,10 ± 0,26

4.3.4.2. Produkcija citokina limfocita iz periferne krvi u prisustvu BGCG11, Muc⁻ derivata i prečišćenog EPS-CG11

Pored merenja proliferacije limfocita, supernatant limfocita tretiranih pod istim uslovima i stimulusima navedenim u prethodnom eksperimentu, je korišćen za merenje nivoa prisustva različitih citokina. Stimulusi su bili: mrtve bakterije (BGCG11 i Muc⁻ derivati NB1, NB4 i NB16), prečišćeni EPS-CG11 (1, 10 and 100 µg/ml), pozitivna kontrola LPS iz *E. coli* 0111:B4 (0,05 µg/ml), a negativna kontrola je bio supernatant limfocita inkubiranih samo u RPMI medijumu. Meren je nivoa prisustva različitih citokina (IFN γ , TNF α , IL-12, IL-10, IL-1 β i IL-17). Test je rađen metodom protočne citometrije (“flow cytometry”) korišćenjem “FacsCantoII flow cytometer” i podaci su analizirani “FCAP array” softverom (BD Biosciences). Uopšteno posmatrano produkcija citokina, vidi se da mrtve ćelije laktobacila (BGCG11, NB1, NB4 i NB16) indukuju značajno viši nivo produkcije (p<0,05) svih testiranih citokina osim IL-17 u odnosu na negativnu kontrolu (citokini limfocita u RPMI medijumu bez stimulusa). Osim toga, BGCG11 nije

modifikovao nivo produkcije IL-12 u odnosu na kontrole, dok su derivati značajno povećali nivo ovog citokina. Takođe je pokazano da nema statistički značajne razlike u nivou produkcije ostalih citokina kad se porede međusobno efekti koje indukuje parentalni soj BGCG11 i Muc⁻ derivati NB1, NB4 i NB16.

Efekat prečišćenog EPS-CG11 na ekspresiju citokina je različit u odnosu na ćelije laktobacila - nivo svih citokina, osim IL-17 je smanjen. Može se zaključiti da je opšti imuni odgovor slabiji kod je prisutan samo EPS polimer kao stimulus. Interesantno je da je dozni efekat EPS-a primećen, tako da se nivo većine citokina blago povećava ukoliko se povećava koncentracija EPS-CG11: IL-10 i IL-1 β se proizvode više ($p < 0,05$) pri najvećoj koncentraciji EPS-a od 100 $\mu\text{g/ml}$ (Slika 6.).



Slika 6. Nivo produkcije citokina (pg/ml) u limfocitima iz periferne krvi šest zdravih donora, nakon inkubacije sa **(a)**: *Lb. paraplantarum* BGCG11 i njegovim Muc⁻ derivatima NB1, NB4 i NB16 u odnosu 5:1 (bakterija: limfocit); **(b)**: kao i sa različitim koncentracijama prečišćenog EPS-CG11 (1, 10 i 100 μg/ml). LPS iz *E. coli* (0,05 μg/ml) je korišćen kao pozitivna kontrola, dok su kao negativna kontrola korišćeni limfociti inkubirani u RPMI medijumu bez stimulusa). Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između svakog stimulusa i kontrole (RPMI) je označena zvezdicom.

Ako bi se rezultati analizirali na način koji ističe odgovor T-pomoćnih ćelija (“T-helper cells” - Th) koji bi mogao da se dobije posle stimulacije limfocita, onda se posmatraju odnosi nivoa produkcije citokina (Tabela 7.). Pro-**Th1** (inflamatorni) odgovor se prati odnosom TNF- α /IL-10, pro-**Th2**-Treg (anti-inflamatorni) odgovor se prati odnosom IL-10/IL-12, a pro-**Th17** (bitan za homeostazu imuniteta mukoze) se analizira odnosom IL-1 β /IL-12. Kad se poredi BGCG11 sa derivatima, iako nema statističke razlike ($p > 0,05$), može se reći da BGCG11 indukuje najviši anti-inflamatorni i pro-Th17 odgovor, dok Muc⁻ derivati ispoljavaju inflamatorni odgovor. U odnosu na negativnu kontrolu, samo je BGCG11 pokazao statistički značajan ($p < 0,05$) viši nivo anti-inflamatornog odgovora. Prečišćeni EPS-CG11 je u koncentraciji od 100 $\mu\text{g/ml}$ ispoljio efekat kao i parentalni soj BGCG11 i ti efekti su bili statistički značajni ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu. Može se zaključiti da je EPS-CG11 uključen u imunosupresivni efekat soja *Lb. paraplantarum* BGCG11.

Tabela 7. Odnosi produkcije citokina iz limfocita periferne krvi, izolovanih iz šest dobrovoljnih davaoca, inkubiranih četiri dana u prisustvu različitih stimulusa Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu su označene zvezdicom.

Stimulus	Odnos citokina (srednja vrednost \pm SD)		
	TNF- α / IL-10 (\uparrow Th1)	IL-10/ IL-12 (\uparrow Th2)	IL-1 β / IL-12 (\uparrow Th17)
RPMI (negativna kontrola)	4,28 \pm 3,63	0,89 \pm 0,21	2,37 \pm 1,61
LPS <i>E.coli</i> (0,05 $\mu\text{g/ml}$)	1,39 \pm 1,13	29,13 \pm 17,71 *	325,95 \pm 258,92 *
BGCG11	133,58 \pm 98,33 *	34,88 \pm 38,34 *	1074,51 \pm 864,45 *
NB1	271,68 \pm 244,21 *	14,91 \pm 14,02	510,78 \pm 435,98 *
NB4	321,01 \pm 322,34 *	11,54 \pm 11,85	438,27 \pm 473,11 *
NB16	274,94 \pm 227,43 *	14,69 \pm 14,01	515,35 \pm 528,76
EPS-BGCG11 (1 $\mu\text{g/ml}$)	1,24 \pm 0,23	0,93 \pm 0,27	0,89 \pm 0,10
EPS-BGCG11 (10 $\mu\text{g/ml}$)	1,54 \pm 0,47	0,87 \pm 0,10	1,47 \pm 0,23
EPS-BGCG11 (100 $\mu\text{g/ml}$)	1,40 \pm 0,61	1,51 \pm 0,28 *	9,89 \pm 4,48 *

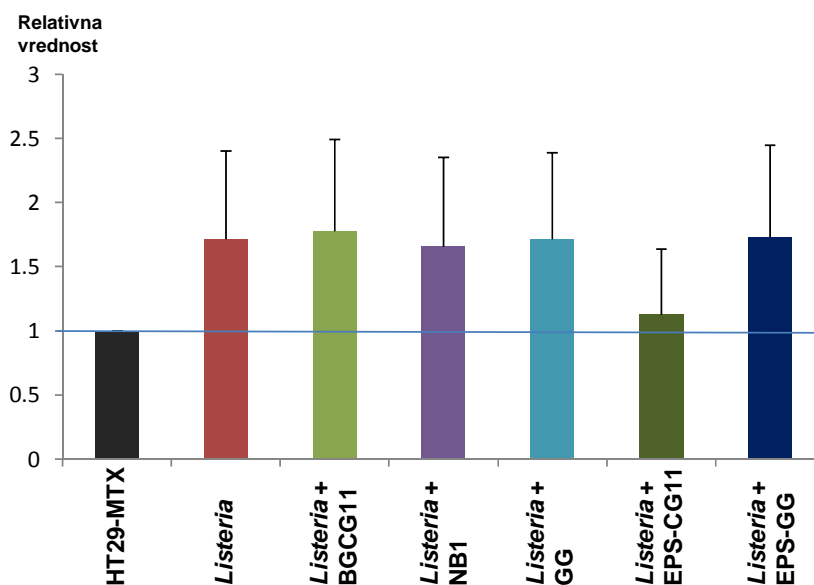
4.3.5. Analiza uticaja soja BGCG11 na HT29-MTX ćelijsku liniju u prisustvu patogenih mikroorganizama

Kao što je već napomenuto, peharaste ćelije HT29-MTX ćelijske linije proizvode mucine i na taj način ovaj *in vitro* sistem bi mogao da predstavlja realniju sliku interakcije sa bakterijama nego kad su u pitanju Caco-2 i HT29 ćelijska linija. Praćen je potencijalni blagotvorni uticaj soja BGCG11 i prečišćenog EPS-CG11 na HT29-MTX ćelijsku liniju u prisustvu različitih patogenih sojeva: *Clostridium difficile* LMG21717, *Salmonella enterica* ser. Thyphimurium LMG15860, *Listeria monocytogenes* LMG13305, *Cronobacter sakazakii* LMG5740, *Escherichia coli* LMG2092, *Shigella sonnei* LMG10473 i *Yersinia enterocolitica* LMG7899. U analizu je uključen i Muc⁻ derivat NB1.

Svaki patogeni soj, laktobacil (BGCG11, Muc⁻ derivat NB1 i *Lb. rhamnosus* GG kao pozitivna kontrola probiotskog efekta), EPS-CG11 (1 mg/ml), kao i EPS-GG (prečišćeni EPS soja GG, isto 1 mg/ml) su inkubirani ponaosob sa HT29-MTX ćelijama. Zatim je rađena koinkubacija laktobacila posebno sa svakim patogenom, u odnosu 1:1, kao i koinkubacija EPS-CG11 ili EPS-GG sa patogenim sojevima ponaosob (u istoj koncentraciji EPS-a kao kad su inkubirani sami sa ćelijskom linijom, 1 mg/ml). Nakon koinkubacije od 3 h, praćen je efekat pomenutih interakcija na HT29-MTX ćelijsku liniju merenjem citotoksičnosti i nivoa produkcije IL-8. Cilj je bio praćenje reakcija eukariotskih ćelija na EPS-CG11 i razlika u delovanju soja *Lb. paraplantarum* BGCG11 u odnosu na već definisani probiotski soj *Lb. rhamnosus* GG u prisustvu patogena.

4.3.5.1. Analiza citotoksičnog efekta patogenih bakterija na HT29-MTX ćelije

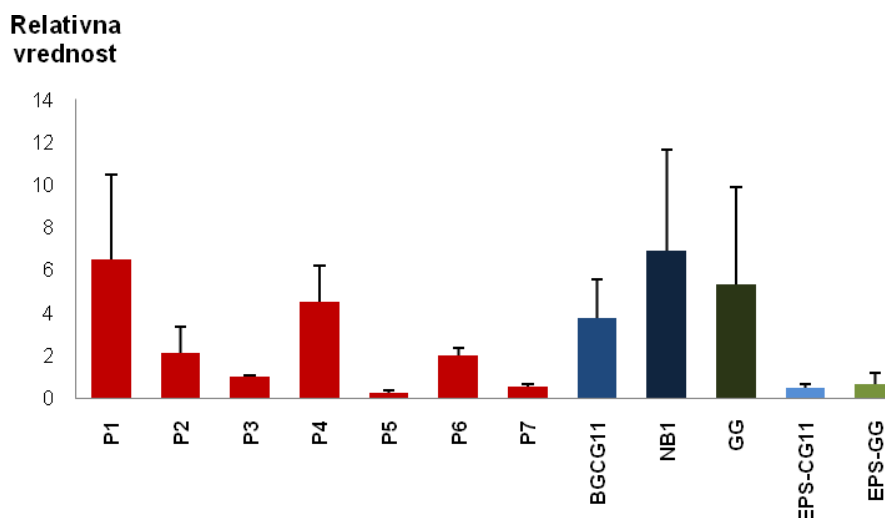
Praćenje citotoksičnog efekta različitih patogena na epitelijalne intestinalne HT29-MTX ćelije je rađeno merenjem nivoa aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) oštećenih ćelija pomoću "Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH)" (Roche). Uočeno je da jedino *L. monocytogenes* LMG13305 u odnosu na ostale testirane patogene, izaziva statistički značajno povećanu ($p < 0,05$) lizu ćelija (Slika 7.). Međutim, rezultati su pokazali da je prilikom koinkubacije *L. monocytogenes* LMG13305 sa EPS-CG11 efekat lize HT29-MTX ćelija smanjen (mada nema statističke značajnosti).



Slika 7. Citotoksičan efekat *L. monocytogenes* LMG13305 na HT29-MTX ćelijsku liniju i promene stepena citotoksičnosti prilikom koinkubacije sa laktobacilima BGCG11, NB1, GG i prečišćenim egzopolisaharidima EPS-CG11 i EPS-GG. Rezultati predstavljaju relativnu vrednost u odnosu na kontrolu (HT29-MTX bez bakterija ili EPS-a).

4.3.5.2. Analiza nivoa produkcije IL-8 u HT29-MTX ćelijskoj liniji u prisustvu različitih patogena i laktobacila

Proinflamatorni citokin IL-8 je uključen u sistem nespecifičnog imuniteta i njegova uloga je da privlači neutrofile koji fagocitiraju mikroorganizme ili njihove delove. U cilju praćenja efekta prisustva laktobacila i EPS-a na HT29-MTX ćelijsku liniju analiziran nivo produkcije IL-8 u HT29-MTX ćelijama nakon inkubacije sa patogenima i laktobacilima, kao i koinkubacije patogena sa laktobacilima i sa EPS-CG11 ili sa EPS-GG. Kao negativna kontrola su korišćene HT29-MTX inkubirane samo u DMEM medijumu. Na Slici 8. prikazane su relativne vrednosti nivoa produkcije IL-8 u odnosu na negativnu kontrolu, mereno sa “Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go![®]” (eBioscience).



Slika 8. Relativne vrednosti produkcije IL-8 u odnosu na negativnu kontrolu nakon inkubacije HT29-MTX sa patogenim bakterijama (**P1**: *Cl. difficile* LMG21717, **P2**: *S. enterica* ser. Thyphimurium LMG15860, **P3**: *L. monocytogenes* LMG13305, **P4**: *Cr. sakazakii* LMG5740, **P5**: *E. coli* LMG2092, **P6**: *Sh. sonnei* LMG10473, **P7**: *Y. enterocolitica* LMG7899), sa laktobacilima (BGCG11, NB1, i GG) kao i sa EPS-CG11 i EPS-GG.

Sa grafika se može uočiti da *Cl. difficile* LMG21717 i *Cr. sakazakii* LMG5740 indukuju najviši relativni nivo produkcije IL-8, dok najmanje indukuju *E. coli* LMG2092 i *Y. enterocolitica* LMG7899. BGCG11 indukuje statistički značajno ($p < 0,05$) slabiji IL-8 odgovor u odnosu na NB1, kao i u odnosu na *Cl. difficile* LMG21717, ali jači odgovor od *L. monocytogenes* LMG13305, *E. coli* LMG2092, *Sh. sonnei* LMG10473, i *Y. enterocolitica* LMG7899. Intenzitet produkcije IL-8 u prisustvu soja GG je statistički značajno ($p < 0,05$) viši samo od produkcije sa sojem *E. coli* LMG2092, mada je u slučaju soja GG uočeno dosta odstupanja od srednje vrednosti produkcije IL-8. EPS-CG11 i EPS-GG indukuju statistički značajno ($p < 0,05$) slabiji odgovor od odgovora koji indukuju BGCG11 i NB1, kao i od većine testiranih patogena.

U Tabeli 8 su prikazane relativne vrednosti produkcije IL-8 u HT29-MTX ćelijskoj liniji kad se poredi koinkubacija patogena sa laktobacilima i patogena sa EPS-CG11 ili sa EPS-GG u odnosu na vrednosti inkubacije samo sa patogenim sojevima ponaosob.

Tabela 8. Relativne vrednosti produkcije IL-8 u HT29-MTX ćelijama u prisustvu različitih kombinacija patogena i laktobacila ili EPS molekula. Relativne vrednosti označene zvezdicom predstavljaju vrednosti produkcije IL-8 koje su statistički značajno različite ($p < 0,05$) od vrednosti koje su dobijene inkubacijom HT29-MTX ćelija samo sa određenim patogenom.

Patogen	Stimulus za HT29-MTX	Relativna produkcija IL-8 (srednja vrednost \pm SD)
P1: <i>Cl. difficile</i> LMG21717	samo P1	6,50 \pm 3,95
	P1 + BGCG11	6,83 \pm 3,68
	P1 + NB1	10,64 \pm 6,29
	P1 + GG	11,78 \pm 8,01
	P1 + EPS-CG11	1,37 \pm 0,24 *
	P1 + EPS-GG	1,15 \pm 0,54 *
P2: <i>S. enterica</i> LMG15660	samo P2	2,11 \pm 1,20
	P2 + BGCG11	4,51 \pm 1,51 *
	P2 + NB1	4,71 \pm 1,51 *
	P2 + GG	3,30 \pm 2,24
	P2 + EPS-CG11	3,27 \pm 1,81
	P2 + EPS-GG	1,74 \pm 0,80
P3: <i>L. monocytogenes</i> LMG13305	samo P3	0,99 \pm 0,09
	P3 + BGCG11	1,57 \pm 0,44 *
	P3 + NB1	2,18 \pm 1,10
	P3 + GG	1,39 \pm 0,52
	P3 + EPS-CG11	0,53 \pm 0,19 *
P4: <i>Cr. sakazakii</i> LMG5740	samo P4	4,51 \pm 1,68
	P4 + BGCG11	6,16 \pm 2,41
	P4 + NB1	5,26 \pm 1,87
	P4 + GG	3,36 \pm 0,69
	P4 + EPS-CG11	4,18 \pm 2,04
	P4 + EPS-GG	2,81 \pm 1,25
P5: <i>E. coli</i> LMG2092	samo P5	0,25 \pm 0,10
	P5 + BGCG11	0,64 \pm 0,44
	P5 + NB1	0,50 \pm 0,15 *
	P5 + GG	0,37 \pm 0,15
	P5 + EPS-CG11	0,32 \pm 0,12
	P5 + EPS-GG	0,88 \pm 0,76
P6: <i>Sh. sonnei</i> LMG10473	samo P6	2,02 \pm 0,35
	P6 + BGCG11	4,50 \pm 1,23 *
	P6 + NB1	3,77 \pm 0,81 *
	P6 + GG	1,80 \pm 0,24
	P6 + EPS-CG11	2,59 \pm 1,67
	P6 + EPS-GG	1,87 \pm 1,05
P7: <i>Y. enterocolitica</i> LMG7899	samo P7	0,53 \pm 0,11
	P7 + BGCG11	1,46 \pm 0,63 *
	P7 + NB1	1,73 \pm 0,81 *
	P7 + GG	1,22 \pm 0,63
	P7 + EPS-CG11	0,44 \pm 0,20
	P7 + EPS-GG	0,74 \pm 0,16

Dobijeni rezultati pokazuju da BGCG11 i NB1 statistički značajno ($p < 0,05$) povećavaju indukciju IL-8 u prisustvu *S. enterica* ser. Thyphimurium LMG15660, *Sh. sonnei*

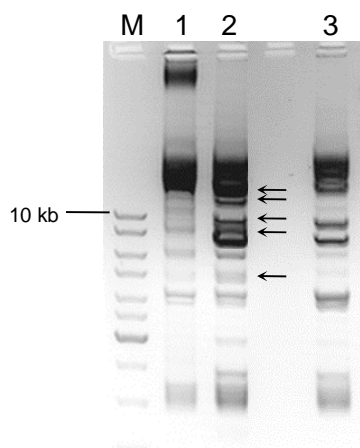
LMG10473 i *Y. enterocolitica* LMG7899, dok prisustvo prečišćenog EPS-CG11 u koinkubaciji sa ovim patogenima to ne čini. Koinkubacija *L. monocytogenes* LMG13305 sa BGCG11 je statistički značajno ($p < 0,05$) povećala produkciju IL-8 kod HT29-MTX ćelija, dok je koinkubacija istog patogena sa EPS-CG11 dovela do smanjenja produkcije ovog citokina. Interesantno je da se statistički značajno ($p < 0,05$) smanjio nivo produkcije IL-8 i kad je HT29-MTX ćelijska linija inkubirana sa *Cl. difficile* LMG21717 u kombinaciji sa oba tipa EPS molekula, ponaosob. Inkubacija HT29-MTX ćelija sa *E. coli* LMG2092 skoro da i ne indukuje produkciju IL-8, dok je nivo produkcije IL-8 blago povećan u prisustvu derivata NB1. Jedino se nakon koinkubacije *Cr. sakazakii* LMG5740 sa laktobacilima ili sa EPS molekulima nivo IL-8 kod HT29-MTX ćelija nije statistički značajno promenio. Na kraju, iz prikazanih rezultata se može generalno zaključiti da različiti molekuli sa površine kako samih patogena, tako i laktobacila modifikuju nespecifični imuni odgovor HT29-MTX ćelijske linije, dok prisustvo prečišćenih EPS molekula uglavnom stišavaju taj odgovor.

4.4. Lokalizacija gena potencijalno odgovornih za sintezu EPS-CG11 i organizacija EPS operona u soju *Lb. paraplantarum* BGCG11

Na osnovu dosadašnjih literaturnih podataka, EPS operoni laktobacila su uglavnom lokalizovani na hromozomu bakterija (Lebeer et al., 2009). Međutim, u prethodnom radu eksperimentalno je pokazano da se u soju *Lb. paraplantarum* BGCG11 EPS operon može naći na velikom plazmidu pCG1 (oko 30 kb) (Kojic et al., 1992). Naime, soj *Lb. paraplantarum* BGCG11, produkuje EPS-CG11 koji mu obezbeđuje rastegljiv fenotip. BGCG11 soj poseduje više plazmida, a nakon čišćenja plazmida tretmanom sa novobiocinom i subletalnom temperaturom dobijeni su derivati koji su izgubili rastegljiv fenotip i označeni su kao Muc⁻ derivati (NB i ST derivati). Pomenuti derivati produkuju EPS u znatno manjoj količini i različitog hemijskog sastava od EPS-CG11 (Kojic et al., 1992; Cerning et al., 1994). Stoga je zaključeno da se genetička informacija za sintezu EPS-CG11 nalazi na pCG1 plazmidu koji nedostaje Muc⁻ derivatima.

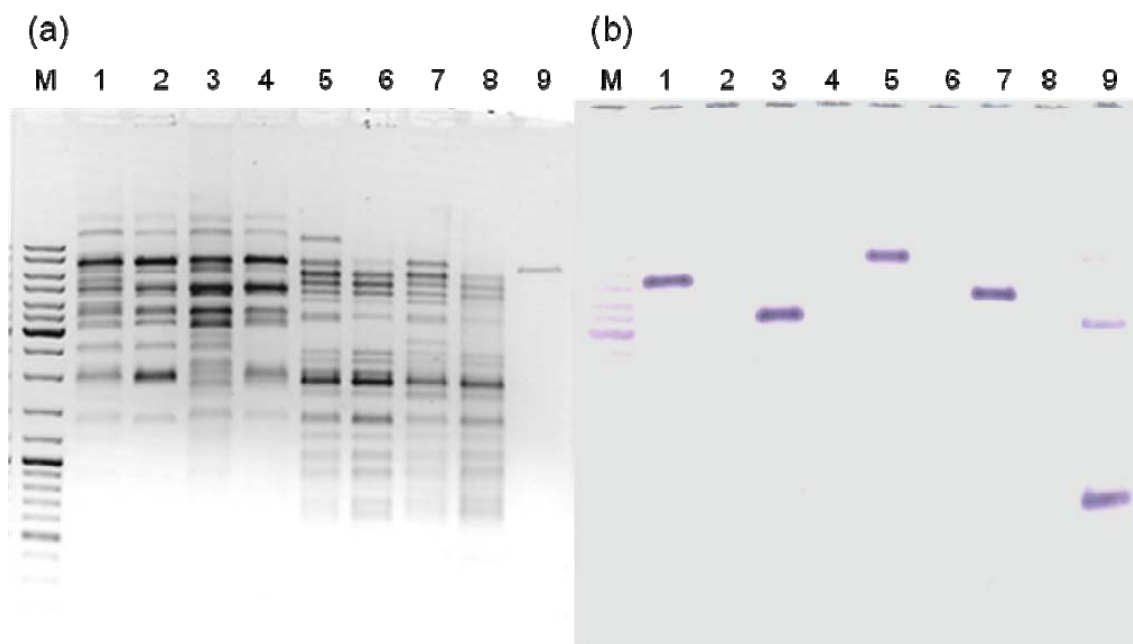
4.4.1. Kloniranje i sekvenciranje 26463 bp poreklom sa pCG1 plazmida soja BGCG11

Plazmidna DNK soja BGCG11 i NB1 derivata je izolovana prema metodi koju su opisali Anderson i McKay (1983) i razdvojena u gradijentu CsCl (Materijal i metode, 3.4.2. i 3.4.3.). Dobijeni plazmidi su sečeni *Bam*HI restrikcionim enzimom i na osnovu profila produkata digestije može se uočiti da derivatu NB1 nedostaje nekoliko plazmidnih traka, koje su poreklom sa velikog pCG1 plazmida (Slika 9.).



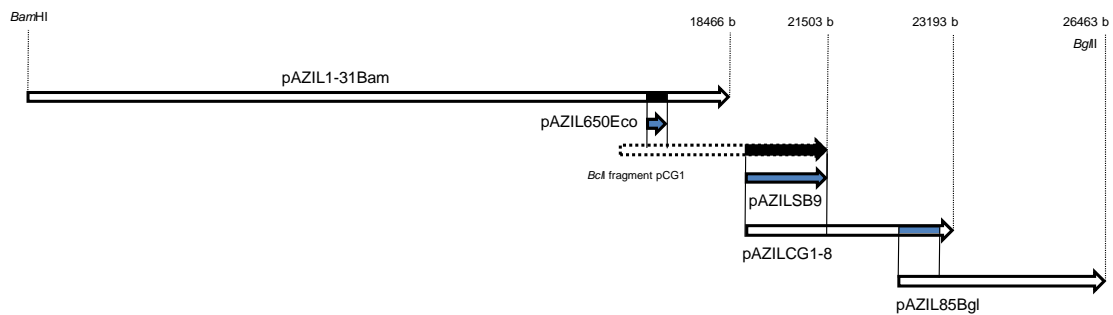
Slika 9. Poređenje plazmidnog profila *Lb. paraplantarum* BGCG11 i njegovog Muc⁻ derivata NB1. M - "GeneRuler DNA Ladder mix", 1 - plazmidna DNK soja BGCG11, 2 - plazmidna DNK soja BGCG11 sečena *Bam*HI restrikcionim enzimom, 3 - plazmidna DNK derivata NB1 sečena *Bam*HI restrikcionim enzimom. Strelice označavaju plazmidne trake koje su prisutne samo u BGCG11.

U cilju karakterizacije velikog pCG1 plazmida totalni plazmidi soja BGCG11 (pCG11) su sečeni *Bam*HI restrikcionim enzimom i klonirani u pAZIL vektor. Dobijenim konstruktima su transformisane *E. coli* DH5 α kompetentne ćelije. Transformanti su sadržali konstrukte sa kloniranim fragmenatima plazmidne DNK soja BGCG11 koji su bili međusobno različite veličine. Za dalju analizu je izabran konstrukt pAZIL1-31Bam koji je sadržao najveći klonirani fragment plazmidne DNK BGCG11. Da bi se proverilo da li konstrukt pAZIL1-31Bam nosi genetički materijal plazmidne DNK soja BGCG11 (ili pCG11) koji je poreklom sa pCG1 plazmida koji nedostaje NB1 derivatu, urađena je DNK-DNK hibridizacija (Slika 10.). Kao DNK proba za hibridizaciju je korišćen fragment iz konstrukta pAZIL650Eco dobijen subkloniranjem *Eco*RI DNK fragmenta dužine 657 bp (poreklom iz konstrukta pAZIL1-31Bam) u pAZIL vektor (Slika 10.) Sekvenciranje fragmenta *Eco*RI DNK iz konstrukta pAZIL650Eco je pokazalo 96% identičnosti na aminokiselinskom nivou sa sekvencom proteina za biosintezu kapsularnog polisaharida soja *Lb. plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917, što je ukazalo na mogućnost da na plazmidu pCG1 postoji EPS operon, kao i da je deo EPS operona sadržan u pAZIL1-31Bam konstrukt.



Slika 10. (a) Elektroforeza plazmidne DNK soja BGCG11 i Muc^- derivata NB1 sečene različitim restrikcijom enzimima, (B) DNK-DNK hibridizacija plazmidne DNK soja BGCG11 i Muc^- derivata NB1 sečene različitim restrikcijom enzimima. Kao proba je korišćen fragment iz konstrukta pAZIL650Eco (sa fragmentom veličine 657 bp poreklom iz konstrukta pAZIL1-31Bam) M - "GeneRuler DNA Ladder mix", 1 - plazmidna DNK soja BGCG11 (pCG11) sečena *SpeI* restrikcijom enzimom (pCG11 *SpeI*), 2 - plazmidna DNK derivata NB1 sečena *SpeI* restrikcijom enzimom (pNB1 *SpeI*), 3 - pCG11 sečena *SpeI* i *BamHI* restrikcijom enzimima, 4 - pNB1 sečena *SpeI* i *BamHI* restrikcijom enzimima, 5 - pCG11 sečena *BclI* restrikcijom enzimom, 6 - pNB1 sečena *BclI* restrikcijom enzimom, 7 - pCG11 sečena *BclI* i *BamHI* restrikcijom enzimima, 8 - pNB1 sečena *BclI* i *BamHI* restrikcijom enzimima, 9 - proba - *EcoRI* fragment (657 bp) poreklom iz pAZIL650Eco konstrukta.

Rezultati DNK-DNK hibridizacije su potvrdili da konstrukt pAZIL1-31Bam nosi genetički materijal poreklom sa velikog pCG1 plazmida koji nije prisutan u NB1 derivatu.



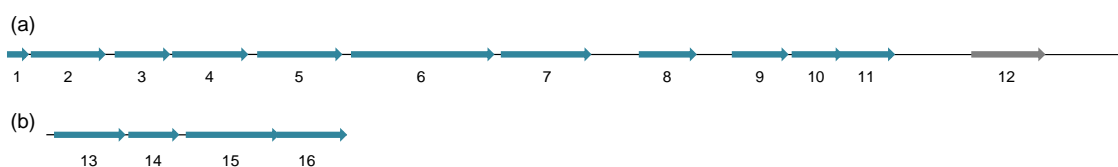
Slika 11. Shematski prikaz kombinovanja metode kloniranja fragmenata iz pCG1 (konstrukti pAZIL1-13Bam, pAZIL650Eco, pAZILSB9, pAZILCG1-8 i pAZIL85Bgl) i metode DNK-DNK hibridizacije sa probama (označene plavom bojom) poreklom iz kloniranih DNK fragmenata pCG1 plazmida radi dobijanja dela sekvence pCG1 plazmida od 26463 bp.

U cilju dalje analize konstrukta pAZIL1-31Bam sekvenciran je ceo DNK fragment dužine 18466 bp prisutan u pAZIL1-31Bam. Dobijeni rezultati su pokazali da sekvencirani DNK fragment dužine 18466 bp sadrži samo deo EPS operona i da je neophodno klonirati i sekvencirati ostatak plazmida pCG1 u cilju karakterizacije kompletnog EPS operona. Rezultati dobijeni DNK-DNK hibridizacijom plazmida pCG1 sečenog različitim restrikcionim enzimima su ukazali da bi ostatak EPS operona mogao da se nalazi na *BclI* DNK fragmentu veličine 6 kb (Shema je na Slici 11.). Stoga su fragmenti pCG11 sečeni *BclI* restrikcionim enzimom i klonirani u pAZIL vektor. Nakon transformacije *E. coli* DH5 α dobijen je konstrukt pAZILSB9 koji je nosio fragment odgovarajuće veličine (Slika 11). Rezultati sekvenciranja su pokazali da fragment pokazuje homologiju sa dTDP-glukozo 4,6-dehidratazom (RfbB protein *Lb. plantarum* subsp. *plantarum* NC8, 99% identičnosti). Dodatnom DNK - DNK hibridizacijom (sa probom veličine 1334 bp, poreklom iz konstrukta pSB9) pokazano je da je potrebno klonirati još jedan *BclI* DNK fragment veličine 3 kb u pAZIL vektor. Nakon kloniranja DNK fragmenti iz klonova odgovarajuće veličine su sekvencirani i rezultati DNK sekvenciranja su potvrdili da je dobijeni konstrukt pAZILCG1-8 (veličine 3022 bp) sadržao nastavak plazmidne pCG1 DNK sekvence. Na isti način, deo kloniranog fragmenta iz konstrukta pAZILCG1-8 (veličine 1002 bp) je korišćen kao proba za DNK-DNK hibridizaciju sa totalnim plazmidima pCG11 da bi se odabrali DNK fragmenti koji nose nastavak nukleotidne sekvence pCG1 plazmida. Rezultati su pokazali da je potrebno klonirati i sekvencirati *BglIII* fragment veličine oko 4,5 kb. Kao rezultat kloniranja *BglIII* fragmenta dobijen je konstrukt

pAZIL85Bgl (sa kloniranim fragmentom veličine 4272 b). Rezultati DNK sekvenciranja su potvrdili da se klonirani *Bgl*III fragment nadovezuje na prethodno dobijenu nukleotidnu sekvencu. Na kraju je, kao rezultat sekvenciranja svih kloniranih fragmenata dobijeno ukupno 26463 bp DNK sekvence pCG1 plazmida soja BGCG11. Sekvenca do sada kloniranih fragmenata pCG1 plazmida od 26463 bp je data u Prilogu A.

4.4.2. Analiza DNK sekvence EPS operona soja BGCG11

Dobijena nukleotidna sekvenca pCG1 plazmida je korišćenjem programa "DNA Strider" analizirana u cilju utvrđivanja potencijalnih otvorenih okvira čitanja (ORF), dok je BLAST program (dostupan na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) korišćen za utvrđivanje homologije sa već poznatim DNK i proteinskim sekvencama. Rezultati su pokazali da početak nukleotidne sekvence od *Bam*HI restrikcionog mesta konstrukta pAZIL1-13Bam pokazuje uglavnom homologiju sa hipotetičnim proteinima, kao i sa nikazom soja *Lb. hilgardii* ATCC 8290 (92% identičnosti na aminokiselinskom (ak) nivou) od 424 ak (pozicija 4761-6032 od početka sekvence fragmenta u konstruktu pAZIL1-31Bam). Nakon nikaze, utvrđena je homologija sa 11 potencijalnih ORF-ova koji su uključeni u sintezu polisaharida, i dodatna 4 ORF-a koji su uključeni u sintezu dTDP-ramnoze od glukozo-1-fosfata (*rfbACBD* operon) koji su razdvojeni transpozazom. Pomenuti ORF-ovi su shematski prikazani na Slici 12. gde se vidi njihov redosled i orijentacija.



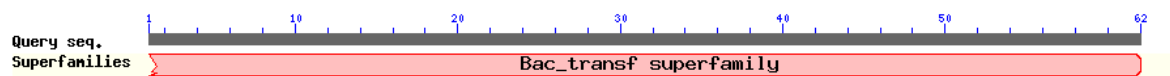
Slika 12. Shematski prikaz ORF-ova u okviru nukleotidne sekvence pCG1 plazmida koji su potencijalno uključeni u sintezu EPS-CG11: (a) - ORF1 do ORF11, transpozaza - ORF 12 -, (b) -ORF 13 do ORF 16 uključeni u sintezu dTDP-ramnoze.

Detaljno poređenje aminokiselinske sekvence svakog od prvih 12 ORF-ova EPS-CG11 operona sa NCBI bazom podataka, pomoću BLAST programa, je prikazano u Tabeli 9.

Tabela 9. Rezultati poređenja aminokiselinske sekvence potencijalnih ORF-ova uključenih u sintezu EPS-CG11 sa NCBI bazom podataka (BLAST). Prikazani su rezultati za proteine sojeva koja su dali najvišu homologiju sa svakim analiziranim ORF-om. Za svaki ORF je dat broj aminokiselina (ak) i pozicija u odnosu na početak sekvence od *Bam*HI restrikcionog mesta.

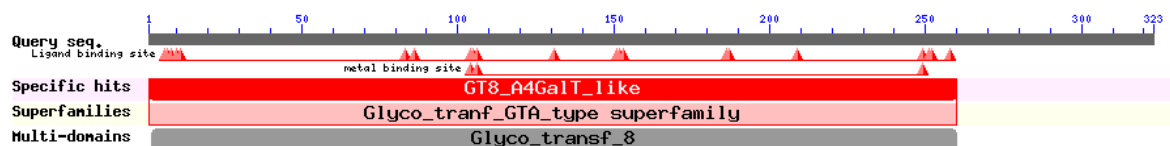
ORF (broj aminokiselina) pozicija	Soj	Naziv proteina sa najvećom homologijom	Identične aminokiseline	Aminokiseline koje pripadaju istoj grupi
ORF 1. (64 ak) 6746-6929	<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> KCTC 3535	Potencijalna primarna glikoziltransferaza	80%	83%
	<i>Lactobacillus animalis</i> KCTC	Undekaprenil-fosfat beta-glukozofosfottransferazom	63%	77%
ORF 2. (321 ak) 6949-7912	<i>Lactobacillus reuteri</i> 100-23	Glikozil transferaza familija 8	36%	60%
ORF 3. (232 ak) 7954-8649	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Potencijalna ribitol fosfottransferaza	51%	69%
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Eps4G	48%	69%
ORF 4. (313 ak) 8762-9700	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	EpsH	33%	56%
ORF 5. (322 ak) 9742-10711	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Potencijalna glikoziltransferaza	36%	58%
	<i>Lactobacillus pentosus</i> IG1	WelL	34%	54%
ORF 6. (473 ak) 10747-12165	<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 53608	Potencijalni protein za biosintezu polisaharida	36%	60%
	<i>Streptococcus sanguinis</i> SK353	Flipaza Wzx	27%	47%
ORF 7. (372 ak) 12194-13300	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Eps11O (potencijalna polisaharid polimeraza)	27%	47%
ORF 8. (225 ak) 13596-14272	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	UDP-D-galaktoza:(glikozil)lipopolisaharid-1, 6-D- galaktoziltransferaza)	42%	63%
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMS2-1	1, 6-galaktoziltransferaza	37%	57%
	<i>Lactobacillus pentosus</i> IG1	1, 6-galaktoziltransferaza	31%	54%
ORF 9. (256 ak) 14522-15288	<i>Lactobacillus pentosus</i> IG1	protein za biosintezu egzopolisaharida	88%	94%
	<i>Lactobacillus pentosus</i> MP-10	protein za biosintezu egzopolisaharida	87%	93%
	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	protein za biosintezu egzopolisaharida, Cps2A	92%	96%
ORF 10. (239 ak) 15302-16020	<i>Lactobacillus pentosus</i> IG1	Protein za biosintezu egzopolisaharida, regulator dužine lanca Wzz	97%	98%
	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	Protein za biosintezu egzopolisaharida, regulator dužine lanca Wzz	94%	96%
ORF 11. (256 ak) 16008-16777	<i>Lactobacillus pentosus</i> IG1	Protein biosinteze kapsularnog polisaharida	91%	95%
	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917	Protein biosinteze kapsularnog polisaharida	91%	95%
	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> NC8	Protein biosinteze kapsularnog polisaharida, fosfotirozin-protein fosfataza	90%	94%
ORF 12. (309 ak) 17354-18279	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	IS30 familija transpozaza	99%	99%

ORF 1 (64 ak) je pokazao najveću homologiju sa potencijalnom primarnom glikoziltransferazom i sa undekaprenil-fosfat beta-glukozofosfottransferazom. Rezultati domenske analize su pokazali da ovaj protein pripada superfamiliji bakterijskih transferaza saharida, a njegov viskokonzervisani C-terminus pripada saharid transferaznom domenu koji ima funkciju u prenosu npr. UDP-glukoze ili UDP-galaktoze na lipidni nosač (undekaprenil fosfat) i tako vrši funkciju primarne glikoziltransferaze u sintezi oligosaharidnog “bloka”.



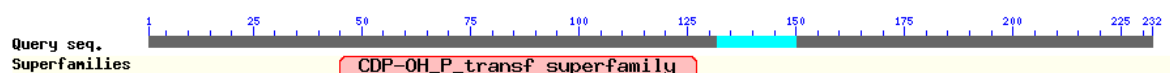
Slika 13. Shematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence ORF 1 (BLAST).

ORF 2 (321 ak) je homolog sa familijom 8 glikoziltransferaza, a rezultati domenske analize upućuju na pripadnost superfamiliji bakterijskih glikoziltransferaza (Slika 14.). Ovaj protein bi mogao da katalizuje dodatak galaktoznog ili glukoznog ostatka na lipooligo- ili lipopolisaharid na površini bakterijskog zida („A4GalT-like“ proteini, familija 8 glikoziltransferaza).



Slika 14. Shematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence ORF 2 (BLAST).

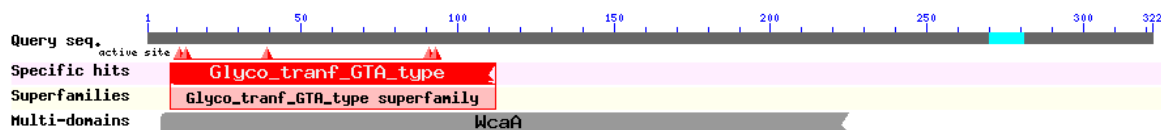
ORF 3 (232 ak) pokazuje najviše homologije sa potencijalnom ribitol fosfottransferazom i sa glikoziltransferazom Eps4G. Analiza domena ovog proteina je prikazana na Slici 15. gde se vidi pripadnost superfamiliji CDP-alkohol fosfatidiltransferaza.



Slika 15. Shematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence ORF 3 (BLAST).

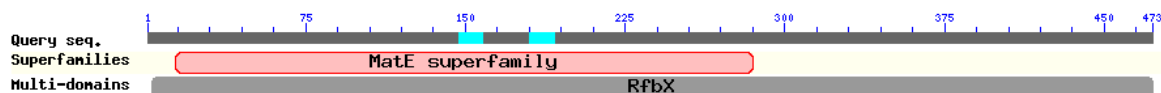
ORF 4 (313 ak) je pokazao najviše identičnosti aminokiselinske sekvence sa EpsH glikoziltransferazom vrste *Lc. lactis* subsp. *cremoris*.

ORF 5 (322 ak) pokazuje najveću homologiju sa potencijalnom glikoziltransferazom. ORF 5 je pokazao i pripadnost superfamiliji bakterijskih glikoziltransferaza GT-A tipa sa multidomenom WcaA ili glikoziltransferaza koje učestvuju u formiranju ćelijskog zida, a prepoznata je i glikoziltransferaza-like familija 2 koje učestvuju u formiranju bakterijske kapsule (Slika 16.).



Slika 16. Shematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence ORF 5 (BLAST).

ORF 6 (473 ak) pokazuje najveću identičnost na nivou aminokiselinske sekvence sa potencijalnim proteinom za biosintezu polisaharida i sa flipazom Wzx koja ima funkciju u translokaciji oligosaharidne jedinice kroz citoplazmatsku membranu. Domenska analiza je ukazala na pripadnost familiji proteina koji učestvuju u biosintezi polisaharida koji su integralni membranski proteini kao i sa RfbX membranskim proteinima koji učestvuju u eksportu O-antigen i teihoične kiseline (Slika 17.).

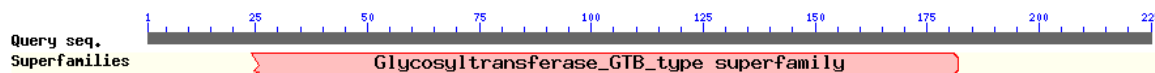


Slika 17. Shematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence ORF 6 (BLAST).

ORF 7 (372 ak) pokazuje najveću homologiju na nivou aminokiselinske sekvence sa potencijalnom polisaharid polimerazom. Nije utvrđena homologija sa nekom od superfamilija proteina.

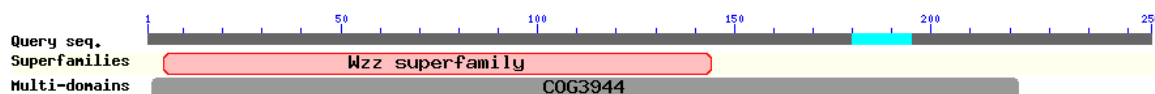
ORF 8 (225 ak) je pokazao najveću identičnosti na nivou aminokiselinske sekvence sa 1,6-galaktoziltransferazom (UDP-D-galaktoza:(glikozil)lipopolisaharid-1, 6-D- galaktozil-transferazom). ORF 8 daje i homologiju sa GTB superfamilijom glikoziltransferaza (Slika 18.) koje imaju zajedničku GTB topologiju gde je velika strukturna homologija N- i C-terminalnih domena uprkos minimalnoj homologiji sekvenci, a veliki rascjep između ovih

domena gde je katalitički centar omogućava veliki stepen fleksibilnosti molekula.



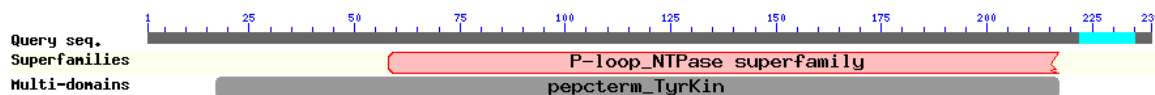
Slika 18. Shematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence ORF 8 (BLAST).

ORF 9 (256 ak) pokazuje 92% identičnosti sa proteinom za biosintezu egzopolisaharida koji određuje dužinu lanca polisaharida (Cps2A). ORF 9 pokazuje homologiju u prvoj polovini aminokiselinske sekvence sa Wzz superfamilijom proteina (Slika 19.) gde su proteini uključeni u sintezu lipopolisaharida (zaduženi za određivanje dužine lanca O-antigen komponente lipopolisaharida), a ovaj region se može naći i kao deo bakterijskih tirozin kinaza. Prvih 220 ak pokazuje sličnost i sa domenom uključenim u biosintezu kapsularnog polisaharida, COG3944 i GumC neokarakterisanog proteina uključenog u sintezu egzopolisaharida.



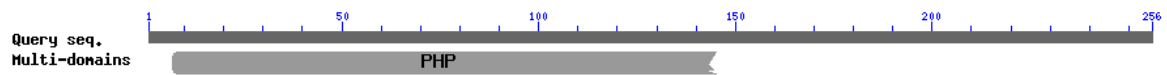
Slika 19. Shematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence ORF 9 (BLAST).

ORF 10 (239 ak) je pokazao 97% identičnosti sa proteinom za biosintezu egzopolisaharida (Cps2B) koji takođe ima ulogu Wzz-regulatora dužine EPS lanca. ORF 10 pokazuje homologiju sa proteinskom familijom koja je povezana sa protein-tirozin autokinazama i sa brojnim proteinima koji određuju dužinu lanca egzopolisaharida. Većina članova ove familije sadrži C-terminalne tirozine koji su mesta za autofosforilaciju i neki od ovih proteina su fuzioni proteini (Slika 20).



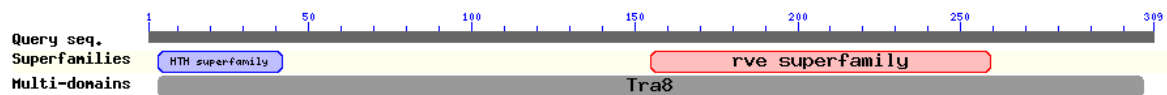
Slika 20. Shematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence ORF 10 (BLAST).

ORF 11 (256 ak) pokazuje 91% identičnosti aminokiselinske sekvence sa proteinom biosinteze kapsularnog polisaharida kao i 90% identičnosti sa fosfotirozin-protein fosfatazom. ORF 11 pokazuje homologiju sa “Polymerase and Histidinol Phosphatase“ (PHP) domenom koji je mogući fosfoesterazni domen. (Slika 21.)



Slika 21. Shematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence ORF 11 (BLAST).

ORF 12 (309 ak) je homolog sa IS30 familijom transpozaza sa 99% identičnosti, što potvrđuje i njegova domenska analiza (Slika 22.)



Slika 22. Shematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence ORF 12 (BLAST).

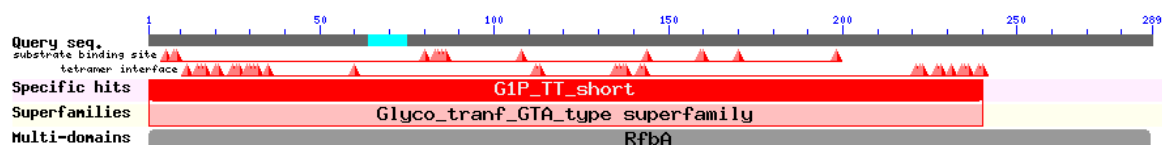
Naredna 4 ORF-a su celina koja bi se mogla okarakterisati kao operon s obzirom da postoji moguće vezujuće mesto za ribozom i mogući promotorski region uzvodno od prvog ORF-a u nizu.

U Tabeli 10. je prikazan stepen identičnosti na aminokiselinskom nivou ORF 13, 14, 15 i 16 sa odgovarajućim prethodno okarakterisanim proteinima.

Tabela 10. Rezultati poređenja aminokiselinske sekvence potencijalnih ORF-ova uključenih u sintezu dTDP-ramnoze sa NCBI bazom podataka (BLAST). Prikazani su rezultati za proteine sojeva koja su dali najvišu homologiju sa svakim analiziranim ORF-om. Za svaki ORF je dat broj aminokiselina (ak) i pozicija u odnosu na početak sekvence od *Bam*HI restrikcionog mesta.

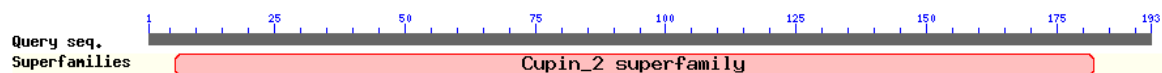
Broj ORF-a (broj aminokiselina) pozicija	Soj	Naziv proteina	Identične aminokiseline	Aminokiseline koje pripadaju istoj grupi
ORF 13. (289 ak) 18437-19302	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	glukoza-1-fosfat timidililtransferaza (RfbA)	98%	99%
	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917	glukoza-1-fosfat timidililtransferaza	96%	98%
	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 25302	glukoza-1-fosfat timidililtransferaza	81%	92%
ORF 14. (193 ak) 19310-19888	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	dTDP-4-dehidroramnozo 3,5-epimeraza (RfbC)	99%	100%
	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917	dTDP-4-dehidroramnozo 3,5-epimeraza	99%	99%
	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	dTDP-4-dehidroramnozo 3,5-epimeraza (RfbC)	98%	99%
ORF 15. (342 ak) 19901-20971	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	dTDP-glukoza 4,6-dehidrataza (RfbB)	99%	100%
	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	dTDP-glukoza 4,6-dehidrataza (RfbB)	99%	100%
ORF 16. (280 ak) 20962-21801	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917	dTDP-4-dehidroramnozo reduktaza	94%	98%
	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> NC8	dTDP-4-dehidroramnozo reduktaza	96%	99%
	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	dTDP-4-dehidroramnozo reduktaza, (RfbD)	95%	97%
	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	dTDP-4-dehidroramnozo reduktaza, (RfbD)	94%	97%

ORF 13 (289 ak) na aminokiselinskom nivou pokazuje 98% identičnosti sa RfbA proteinom. ORF 13 ima homologiju sa glukozo-1-fosfat timidililtransferazom koja katalizuje formiranje dTDP-glukoze (od dTTP i glukozo-1-fosfata) i koja je prvi enzim u biosintezi dTDP-L-ramnoze, koja ulazi u sastavu ćelijskog zida, a ujedno je i putem povratne sprege inhibitor pomenutog enzima (Slika 23.)



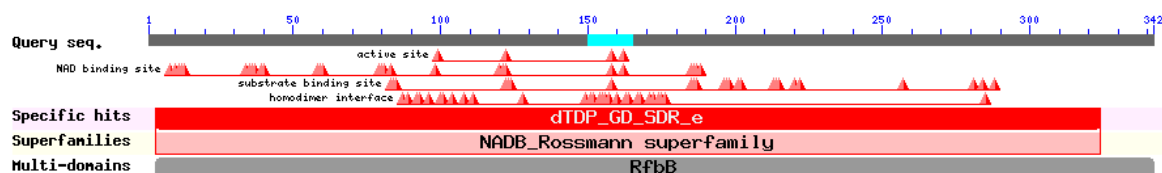
Slika 23. Shematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence ORF 13 (BLAST).

ORF 14 (193 ak) je pokazao 99% identičnosti na aminokiselinskom nivou sa RfbC proteinom. RfbC je dTDP-4-dehidroramnozo 3,5-epimeraza, koja pripada familiji proteina koji katalizuju izomerizaciju dTDP-4-dehidro-6-deoksi-D-glukoze sa dTDP-4-dehidro-6-deoksi- L-manozom (Slika 24.).



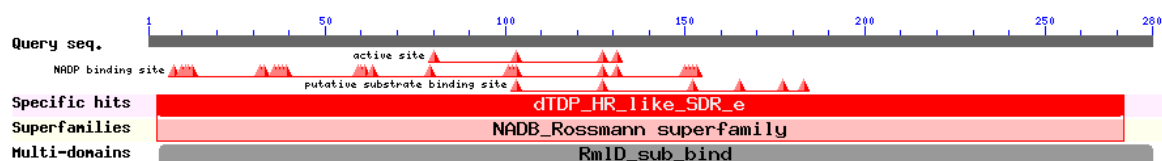
Slika 24. Shematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence ORF 14 (BLAST).

ORF 15 (342 ak) pokazuje 99% identičnosti na aminokiselinskom nivou sa RfbB proteinom. Domenska analiza aminokiselinske sekvence ORF 15 je prikazana na Slici 25. Enzim RfbB ili dTDP-D-glukozo 4,6-dehidrataza, katalizuje drugi od četiri koraka u sintezi dTDP-L-ramnoze: dehidratacija dTDP-D-glukoze do dTDP-4-keto-6-deoksi-D-glukoze.



Slika 25. Shematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence ORF 15 (BLAST).

ORF 16 (280 ak) je pokazao 94 % identičnosti na aminokiselinskom nivou sa RfbD proteinom ili dTDP-4-dehidroramnozo reduktazom. Rezultati domenske analize ovog proteina su prikazani na Slici 26. RmlD supstrat vezujući domen je odgovoran za vezivanje dTDP-L-ramnoze.



Slika 26. Shematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence ORF 16 (BLAST).

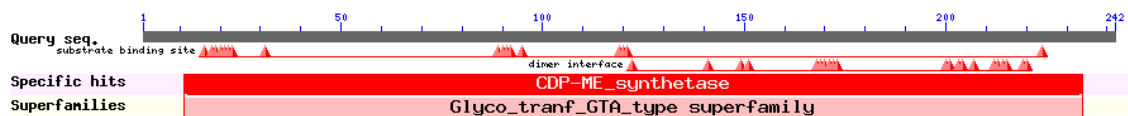
Nakon pomenutih 16 ORF-ova u do sada utvrđenoj nukleotidnoj sekvenci pCG1 slede ORF 17 i ORF 18 (Tabela 11.), kao i dve potencijalne transpozaze suprotne orijentacije od svih do sad okarakterisanih ORF-ova u pCG1 sekvenci (Tabela 11.).

Tabela 11. Rezultati poređenja aminokiselinske sekvence potencijalnih ORF-ova sa poznate pCG1 sekvence sa NCBI bazom podataka (BLAST programom). Prikazani su rezultati koji su dali najvišu homologiju sa svakim analiziranim ORF-om. Za svaki ORF je dat broj aminokiselina i pozicija u odnosu na početak sekvence od *Bam*HI restrikcionog mesta.

Broj ORF-a (broj aminokiselina) pozicija	Soj	Naziv proteina	Identične aminokiseline	Aminokiseline koje pripadaju istoj grupi
ORF 17. (242 ak) 22243-22968	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat citidililtransferaza	99%	99%
	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	D-ribitol-5-fosfat citidililtransferaza	98%	99%
ORF 18. (340 ak) 22973-23995	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	ribitol-5-fosfat 2-dehidrogenaza	100%	100%
ORF 19. (309 ak) 25403-24477	<i>Lactobacillus pentosus</i> IG1	transpozaza TraISLp11	97%	98%
	<i>Lactobacillus mali</i> KCTC 3596 = DSM 20444	IS30 familija transpozaza	95%	98%
ORF 20. (301 ak) 26360-25458	<i>Lactobacillus sakei</i>	potencijalna transpozaza	99%	99%

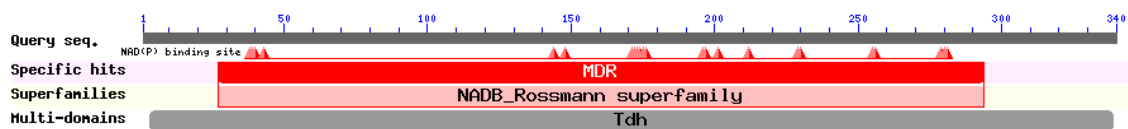
ORF 17 (242 ak) je na osnovu aminokiselinske sekvence pokazao najveću homologiju sa 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat citidililtransferaza i sa D-ribitol-5-fosfat citidililtransferaza. Njegova domenska analiza ukazuje na pripadnost superfamiliji GTA glikoziltransferaza (Slika 27.). Pored toga, 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat citidililtransferaza katalizuje treći korak u alternativnom (ne-mevalonat) putu sinteze izopentenil difosfata

(IPP). Ovim putem se koristi piruvat i gliceraldehid 3-fosfat kao polazni materijal za sintezu IPP kod mnogih bakterija, arhea i biljnih ćelija, ali ne i kod sisara.



Slika 27. Shematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence ORF 17 (BLAST).

ORF 18 je na osnovu aminokiselinske sekvence pokazao identičnost sa ribitol-5-fosfat 2-dehidrogenazom. Na Slici 28. je rezultat domenske analize gde se uočava homologija sa reduktazom/dehidrogenazom srednje dužine lanca u okviru familije cink-zavisnih alkoholnih dehidrogenaza. Pripada istoj superfamiliji GTA glikoziltransferaza kao i ORF 17.



Slika 28. Shematski prikaz rezultata domenske analize aminokiselinske sekvence ORF 18 (BLAST).

ORF 19 (309 ak) i **ORF 20** (301 ak) su pozicionirani u suprotnoj orijentaciji u odnosu na sve prethodno navedene ORF-ove. ORF 19 pokazuje 97% identičnosti sa transpozazom, slično kao i ORF 20 koji pokazuje 99% identičnosti na nivou aminokiselinske sekvence sa potencijalnom transpozazom.

Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da je genetička informacija za EPS-CG11 locirana na plazmidnoj DNK soja BGCG11, u okviru pCG1 plazmida koji nedostaje Muc⁻ derivatima.

Iz literature je poznato da se u okviru EPS operona (za HePS tip EPS molekula) razlikuju regioni koji sadrže glikoziltransferaze, gene uključene u translokaciju ponavljajućih jedinica polisaharida kroz membranu bakterije, polimerizaciju, odnosno određivanje dužine lanca polisaharida i regulaciju *eps* gena (Broadbent et al., 2003). Potencijalni operon za EPS-CG11, okarakterisan na nivou nukleotidne sekvence koja je prevedena u aminokiselinsku sekvencu, sadrži glikoziltransferaze (ORF 1, 2, 3, 4, 5 i ORF

8) koje sintetišu prekursore ponavljajućih jedinica, gen uključen u translokaciju ponavljajućih jedinica polisaharida kroz membranu bakterije (ORF 6), polimerizaciju EPS-a (ORF 7) i određivanje dužine lanca polisaharida (ORF 9, ORF 10 i najverovatnije ORF 11). Osim toga, iako je poznato da je kod velikog broja BMK ramnoza karakteristična komponenta u sastavu ćelijskog zida, na osnovu lokacije gena za biosintezu ramnoze, neposredno nizvodno od EPS operona, kao i na osnovu prethodno dobijenih rezultata koji su pokazali da je EPS-CG11 specifičan po biohemijskoj strukturi po tome što sadrži veliki procenat ramnoze, može se pretpostaviti da ORF 13, 14, 15 i 16 svojom aktivnošću uključuju ramnozu u originalnu strukturu EPS-CG11.

5. DISKUSIJA

Još od kraja XIX veka, poznato je da su mikroorganizmi uzročnici raznih bolesti. Od tada se istraživanja fokusiraju na patogene bakterije. Međutim, početkom XX veka uočeno je da pored proučavanja patogena treba usmeiti pažnju na analizu komensalne mikroflore prvenstveno u gastrointestinalnom traktu (GIT). Poslednjih 50 godina su se razvile brojne metode rada sa "germ-free" laboratorijskim životinjama, što je uticalo da se uoči bitna funkcija komensalnih mikroorganizama kao simbionata koji produkuju esencijalne vitamine, nutrijente, kompetiraju sa patogenim mikroorganizmima i pomažu sazrevanju intestinalnog imuniteta (Backhed et al., 2005). Iako crevna mikroflora vrši vrlo bitne funkcije za svog domaćina, mnoge bolesti koje se karakterišu inflamacijom i poremećenom imunomodulacijom su upravo posledica promena regulacije interakcije između mikroorganizama i domaćina (Round and Mazmanian, 2009). Iz tih razloga, proučavaju se mikroorganizmi kao probiotici koji bi svojom aktivnošću doveli do povratka homeostaze i poboljšanju zdravstvenog statusa domaćina.

Kolonizacija GIT-a bakterijama počinje pri rođenju i nastavlja se tokom celog života . U humanom GIT-u laktobacili čine 0,01 do 0,6% od ukupnog broja fekalnih mikroorganizama. Kroz viševekovnu konzumaciju fermentisanih prehrambenih proizvoda, laktobacili i druge vrste BMK, kao i njihovi metaboliti se konstantno unose u ljudski organizam. Najveći broj laktobacila imaju GRAS ("generally recognized as safe") status i do sada je već preko 30 vrsta roda *Lactobacillus* okarakterisano kao bezbedno za korišćenje prema kriterijumima EFSA ("European food safety authority") (EFSA, 2009).

Interakcija bakterija sa mukozom creva i epitelijalnim ćelijama GIT zavisi od površinskih molekula bakterija. Laktobacili, kao Gram-pozitivne bakterije, na svojoj površini imaju debeo višeslojni peptidoglikanski sloj koji je združen sa proteinima, teihoičnom kiselinom i polisaharidima. Sastav i kombinacija pomenutih molekularnih struktura su specifični za vrstu, ali i za bakterijski soj (Delcour et al., 1999). BG kolekcija (kolekcija bakterija mlečne kiseline Laboratorije za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, Beograd) sadrži sojeve laktobacila koji ispoljavaju autoagregaciju, produkuju

bakteriocine, proteinaze i egzopolisaharide što im daje specifične osobine (Kojic et al., 1992; Topisirovic et al., 2006; Lozo et al., 2007). S obzirom da pomenute karakteristike imaju značaj za probiotički potencijal laktobacila, cilj ovog rada je bio karakterizacija faktora uključenih u proces agregacije, kao i funkcionalna karakterizacija egzopolisaharida (EPS) prirodnih izolata laktobacila.

5.1. Analiza agregacije odabranih sojeva laktobacila

Agregacija bakterija kao grupisanje bakterijskih ćelija u tečnoj kulturi istog soja se naziva autoagregacija, a kada su u pitanju ćelije različitih vrsta bakterija zove se koagregacija. Agregacija se može smatrati selektivnim kriterijumom pri biranju probiotika, jer koagregacija probiotika sa intestinalnim patogenima može da dovede do uklanjanja patogena iz GIT-a (Schachtsiek et al., 2004). U cilju karakterisanja prirode molekula koje učestvuju u agregaciji u ovom radu su korišćeni sojevi laktobacila poreklom iz sireva, od kojih je većina pripada grupi *Lactobacillus casei* a jedan je predstavnik *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Iz literature je poznato da neki predstavnici vrsta *Lb. casei* i *Lb. acidophilus* izolovani iz tradicionalnih fermentisanih mlečnih proizvoda pokazuju visok stepen agregacije (Mathara et al., 2008). Analizirani laktobacili BG kolekcije agregiraju različitom brzinom i formiraju agregate ćelija koji su međusobno vizuelno različiti. Zajednička karakteristika svim analiziranim laktobacilima koji agregiraju jeste osetljivost na tretman proteinazom K, na osnovu čega može da se zaključi da je neki od faktora uključenih u agregaciju proteinske prirode. U prethodnim istraživanjima je pokazano da je u soju *Lb. paracasei* BGSJ2-8 na površini ćelija prisutan protein veći od 200 kDa, koji odsustvuje u neagregirajućem spontanom mutantu BGSJ2-81 (Lozo et al., 2007). I kod drugih laktobacila je pokazano prisustvo proteina velike molekulske mase kao medijatora agregacije. Pokazano je da MUB protein (353 kDa) soja *Lb. reuteri* ATCC 53608 koji ima ulogu vezivanja za mukus, učestvuje i u autoagregaciji. Derivat 1063N pomenutog soja usled mutacije produkuje kraći MUB protein kojem nedostaje C-terminalni LPxTG region, usled čega ne može da ostane vezan za ćelijski zid. Ovaj mutant ima smanjenu sposobnost vezivanja za mukus i sposobnost agregacije (MacKenzie et al., 2010). Soj BGSJ2-8 je koagregirao sa drugim bakterijama (*Listeria innocua* ATCC33090, *Escherichia coli* ATCC25922 ili *Salmonella enterica* ser. Typhimurium TR251) ali je uočeno da je ova

interakcija takođe narušena tretmanom proteinazom K (Nikolic et al., 2010). Slično je pokazano i kod drugih laktobacila koji agregiraju, kao kod *Lb. coryniformis* DSM 20001 (Schachtsiek et al., 2004), pa se može zaključiti da su faktori odgovorni za koagregaciju, kao i faktori uključeni u autoagregaciju, proteinske prirode.

Pored proteina kod nekih laktobacila i drugi molekuli utiču na agregacione sposobnosti. U ovom radu je pokazano da se autoagregacija analiziranih laktobacila gubi pranjem u bidestilovanoj vodi, pa je moguće da su za proces agregacije neophodni i određeni joni koji obezbeđuju da se ostvari interakcija između ćelija. Gubitak agregacije u bidestilovanoj vodi nije uočen jedino u soju BGDP1-84 koji najverovatnije ima drugačiji mehanizam interakcije ćelija u odnosu na ostale sojeve. Na osnovu dobijenih rezultata, zaključak je da pristup analizi agregacije treba prilagoditi za svaki soj laktobacila ponaosob, s obzirom da je uočeno da se ova karakteristika razlikuje i kod blisko srodnih vrsta (konkretno kod analiziranih sojeva *Lb. casei* grupe). Osim toga, iz literature je poznato na agregaciju mogu da utiču egzopolisaharidi. Tako je, na primer, pokazano da EPS soja *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Aslim et al., 2007) utiče na agregaciju, mada u našem radu nije uočeno da analizirani soj koji agregira *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BGDU4-71 produkuje EPS. Takođe, u agregaciji i formiranju biofilma u soju *Lb. reuteri* TMW1.106 učestvuje homopolisaharid glukan (pokazano sa mutantima za glikoziltransferazu i inulosukrazu) (Walter et al., 2008).

Adhezivna svojstva BMK čine različite vrste interakcija kao što su pasivne sile, elektrostatičke interakcije, hidrofobne sterne sile, LTAs i lektini (Servin, 2004). Rezultati analize hidrofobnosti su pokazali da odabrani laktobacili koji agregiraju imaju visok afinitet za heksadekan usled hidrofobne površine ćelije (Nikolic et al., 2010). Visoka hidrofobnost je i u predhodnim istraživanjima bila povezana sa autoagregacijom, preko 70% ćelija soja *Lb. plantarum* IS-10506, koji ispoljava visoki stepen autoagregacije, su se vezale za ksilen (Collado et al., 2007). Hidrofobna priroda ćelijske površine mikroorganizama može da im olakša adheziju za intestinalni epitel, što obezbeđuje prednost u kompeticiji sa patogenima i kolonizaciji GIT-a (Vinderola and Reinheimer, 2003). Takođe, poznato je da *Lb. crispatus* koji agregira, ima veću adheziju za Caco-2 ćelije od svog neagregirajućeg mutanta (Ocaña and Nader-Macías, 2002). U skorašnjoj

studiji adhezije različitih laktobacila za tri ćelijske linije, MALDI-TOF/MS analizom ekstracelularnog proteoma, uočeno je da su kolagen-vezujući A prekursor, kao i proteini slični proteinima koji učestvuju u agregaciji su oni koji najverovatnije utiču na adheziju za Caco2 i HeLa ćelije (Martín et al., 2012). Interesantni su rezultati istraživanja poređenja osobina parentalnog soja *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 sa derivatom rezistentnim na žučne soli. Primećeno je da derivat iako bolje preživljava fiziološke koncentracije žučnih soli i intestinalnog soka (praćeno *in vivo* u miševima), ima smanjenu hidrofobnost ćelijske površine, smanjenu autoagregaciju i adhezivne sposobnosti u odnosu na parentalni soj (Burns et al., 2011a). Usled toga je neophodno da se uvek koristi više nezavisnih pristupa u analizi adhezije i agregacije, jer zaključci rezultata testova *in vitro* treba da se potvrde i u *in vivo* uslovima.

Specifična ireverzibilna interakcija između bakterija i eukariotskih ćelija može da se odvija između proteina na bakterijskoj površini i specifičnih receptora na eukariotskim ćelijama. Pokazano je da sposobnost agregacije obezbeđuje soju *Lb. crispatus* M247 duži opstanak u debelom crevu, s obzirom da je pokazano da njegov mutant MU5 koji ne agregira nije uspešno izolovan iz fecesa i mukoze debelog creva (Voltan et al., 2007). Neobično velika razlika u hidrofobnosti soja BGSJ2-8 u odnosu na derivat BGSJ2-81, pokazana u ovom radu, ukazuje na to da se na površini ćelija soja BGSJ2-8 nalaze proteini koji njegovu površinu čine hidrofobnom.

Osim toga, s obzirom da je genom soja BGSJ2-8 sekvenciran, uočeno je prisustvo potencijalnih ORF-ova koji bi mogli biti odgovorni za produkciju polisaharida vezanog za ćelijski zid (CPS). Prisustvo CPS može da pruži dodatno objašnjenje za razliku u hidrofobnosti između soja BGSJ2-8 i njegovog Agg⁻ derivata, tako što nakon gubitka proteina agregacije u derivatu BGSJ2-81 CPS čine površinu ćelija izuzetno hidrofилnom. Dalja analiza *cps* gena u soju BGSJ2-8 biće od velikog značaja, s obzirom da je već pokazano da soj *Lb. casei* Shirota proizvodi polisaharid koji je u asocijaciji sa ćelijskim zidom čija frakcija sa velikom molekulskom masom ima supresivni efekat na aktivaciju makrofaga (Yasuda et al., 2008). Takođe, najnovije analize sekvence genoma BGSJ2-8 su pokazale da u hromozomu ovog soja postoji ORF čija homologija domena (analizirano BLAST programom) u proteinskoj bazi podataka (PFAM) daje homologiju sa kolagen-

vezujućim površinskim proteinima. Ako se uzmu u razmatranje rezultati koji su dobijeni sa *Lb. reuteri* ATCC 53608 kod koga se smatra da dva različita proteina imaju ulogu u agregaciji (Roos et al., 1999; MacKenzie et al., 2010), moguće je da je agregacija kod BGSJ2-8 multifaktorijski sistem zavisan od više proteina kao i nekih jona.

Na osnovu svega navedenog soj BGSJ2-8 je izuzetno interesantan jer produkuje bakteriocine, ispoljava auto- i koagregaciju, poseduje površinske polisaharide i najverovatnije neki od proteina koji omogućava interakciju sa kolagenom ili sličnim molekulima eukariotskih ćelija. Soj BGSJ2-8 treba dalje analizirati u *in vitro* i *in vivo* sistemima kako bi na osnovu dobijenih rezultata mogla da se odredi ciljna grupa zdravstvenih poremećaja domaćina za koje bi ovaj soj potencijalno ispoljio probiotička svojstva.

5.2. Analiza probiotičkog potencijala soja *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11, producenta heteropolisaharida

Pored proteina, bakterijski površinski polisaharidi su ključni molekuli koji učestvuju u interakciji mikroorganizama i domaćina. Lipopolisaharidi (LPS), kapsularni polisaharidi (CPS) i egzopolisaharidi (EPS) su molekuli raznovrsni po pitanju sastava, grananja i veličine molekula (Lebeer et al., 2009). EPS mogu po hemijskom sastavu da budu homopolisaharidi (HoPS), kada su sačinjeni od istih monomera ili heteropolisaharidi (HePS) - sačinjeni od različitih tipova monomera (Ruas-Madiedo et al., 2008). EPS koji proizvode BMK može da utiče na adheziju probiotika i patogena za sluzokožu creva i tako pozitivno utiče na zdravlje ljudi (Ruas-Madiedo et al., 2008). *Lb. paraplantarum* BGCG11, producent EPS-a (heteropolisaharida) je izolovan iz belog, mekog sira proizvedenog u domaćinstvu. Pokazano je da sastav EPS-CG11 zavisi od sastava medijuma i uslova u kojim raste bakterije. Derivati soja BGCG11 dobijeni tretmanom sa novobiocinom (NB derivati) i subletalnom temperaturom (ST derivati) su izgubili veliki plazmid pCG1 (oko 30 kb), produkuju rezidualnu količinu EPS-a sa manjim procentom ramnoze u odnosu na BGCG11 (ne produkuju EPS-CG11) i nemaju rastegljivi fenotip kao BGCG11 i zato se jednim imenom označavaju kao Muc⁻derivati (Kojic et al., 1992; Cerning et al., 1994). S obzirom na produkciju specifičnog EPS polimera BGCG11 je

izabran kao interesantan kandidat za testiranje potencijalnih probiotičkih osobina. Takođe je od velikog značaja i da se utvrdi lokalizacija i struktura genskog operona koji je odgovoran za sintezu EPS-CG11 polimera.

Prema FAO-WHO ("Food and Agriculture Organization of the United Nations - World Health Organization") uputstvu za procenu probiotika koji se koriste za humanu upotrebu (FAO-WHO 2006), preživljavanje bakterija u uslovima simuliranog GIT-a je jedno od najpoželjnijih svojstava koje soj sa potencijalnim probiotičkim svojstvima treba da poseduje. Rezultati dobijeni u ovom radu su pokazali da oko 1-2% ćelija soja *Lb. paraplantarum* BGCG11, kao i njegovih Muc⁻derivata (NB1, NB4 i NB16) preživljava simulirani prolazak kroz GIT kada su resuspendovani u mleku, što je prethodno pokazano u istraživanjima drugih autora. Naime primećeno je da unošenje bakterija putem hrane poboljšava njihovo preživljavanje kroz GIT zbog puferskih osobina i zaštitnog efekta komponenti iz hrane (Ranadheera et al., 2010). S obzirom da je BGCG11 izolovan iz mlečnog proizvoda, mleko donekle predstavlja uobičajenu sredinu u kojoj bi se takav soj i mogao konzumirati. Takođe, kada se pogleda uticaj želudačnog soka na BGCG11 i derivate resuspendovane u mleku, praktično da nema štetnog efekta jer oko 80% ćelija preživljava. To može biti i efekat pre-adaptacije bakterija na kiselu sredinu u prirodnom okruženju odakle su izolovani (Kojic et al., 1992; Terzic-Vidojevic et al., 2007). Slično ponašanje u simuliranim GIT uslovima je pokazano i za druge vrste laktobacila poreklom iz hrane, kao što je *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 193 (Burns et al., 2011b) kao i za enterokoke i laktokoke iz fermentisanih mlečnih proizvoda (Faye et al., 2012). Zanimljiv je i podatak da i komercijalni probiotički sojevi (*Lb. casei* subsp. *shirota*, *Lb. casei* subsp. *immunitas*, *Lb. acidophilus* subsp. *johnsonii*) mnogo bolje preživljavaju simulirane uslove prolaska kroz GIT u mleku nego kad se resuspenduju u vodi (Lo Curto et al., 2011).

Kad se posmatra prolazak kroz druge faze simuliranih uslova u GIT-u, pokazano je da preživljavanje BGCG11 i derivata naglo opada nakon izlaganja žučnim solima i enzimima pankreasa, koji predstavljaju stresni faktor za ove laktobacile, sa kojim se nisu susretali u svom prirodnom okruženju. Međutim, rezultati analize probiotičkog potencijala laktobacila izolovanih iz tradicionalnog fermentisanog mlečnog proizvoda Masaija, su pokazali visoku rezistenciju laktobacila na želudačni sok i prisustvo žučnih soli. Posebno su sojevi vrste

Lb. fermentum pokazali izuzetno visok procenat preživljavanja od skoro 100% nakon izlaganja želudačnom soku i fiziološkim koncentracijama žučnih soli, tako da se može zaključiti da preživljavanje zavisi i od osobina svojstvenih određenoj vrsti laktobacila (Mathara et al., 2008). Što se tiče poređenja preživljavanja BGCG11 i derivata koji ne proizvode EPS-CG11, jedino je derivat NB1 pokazao nešto bolje preživljavanje u odnosu na ostale derivate i parentalni soj BGCG11, što može biti posledica nešto većeg početnog broja bakterija ovog derivata (početni CFU/ml: parentalni BGCG11 $8,5 \pm 0,1$; derivati NB1 $9,1 \pm 0,01$, NB4 $8,9 \pm 0,1$ i NB16 $8,9 \pm 0,1$). Iz dobijenih rezultata preživljavanja, može se zaključiti da EPS-CG11 najverovatnije nema zaštitni efekat na preživljavanje soja BGCG11. U korelaciji sa dobijenim rezultatima je i podatak da ni kod *Streptococcus thermophilus* CRL 1190 i *Lb. casei* CRL 87 EPS molekuli nisu pokazali zaštitni efekat u *in vitro* testovima na prisustvo želudačne kiseline, kada se porede preživljavanja parentalnih sojeva sa mutantima koji ne sintetišu EPS (Mozzi et al., 2009). Slično je pokazano i kada je poređeno preživljavanje EPS-proizvođača *Lb. debrueckii* subsp. *lactis* 193 u simuliranim uslovima GIT je poređeno sa preživljavanjem njegovog derivata 193+, koji ima stabilan fenotip rezistencije na žučne soli i koji proizvode više EPS-a, pri čemu je uočeno da derivat 193+ nije bolje preživljavao od parentalnog soja 193 (Burns et al., 2011b). Interesantno je da kod *Bifidobacterium longum* NB667 i 667Co EPS ne doprinosi boljem preživljavanju u želudačnom i duodenalnom soku ljudskog porekla, dok EPS polimer sojeva *B. animalis* subsp. *lactis* efikasno održava broj i vijabilitet bakterija tokom nakon prolaska kroz simulirane uslove GIT-a (de los Reyes-Gavilán et al., 2011). Iz navedenih rezultata se može zaključiti da je uloga EPS-a u zaštiti sojeva od stresnih uslova u GIT-u specifična kako i za tip EPS molekula tako i za sojeve koji ga proizvode. Međutim značajno je istaći da tokom prolaska EPS-CG11 kroz simulirani GIT ne dolazi do digestije ovog polimera. Stabilnost EPS molekula je još ranije primećena i kod drugih EPS polimera koje sintetišu BMK i bifidobakterije, verovatno zato što su rezistentni na kiselu hidrolizu (Salazar et al., 2009).

Drugi kriterijum po FAO-WHO uputstvu za selekciju probiotičkih sojeva jeste potencijal sojeva da kolonizuju intestinalnu mukozu. Da bi ova karakteristika mogla što preciznije da se analizira, razvijeni su različiti *in vitro* i *in vivo* modeli. U ovom radu korišćen je *in vitro* pristup praćenja adhezije soja BGCG11 i njegovih Muc⁻ derivata za tri

intestinalne epitelijalne ćelijske linije (Caco-2, HT29 i HT29-MTX), a dobijene vrednosti su poredene sa vrednostima adhezije soja *Lb. rhamnosus* GG za koji je već poznato da pokazuje dobru adheziju za intestinalnu mukozu (Laparra and Sanz 2009; Vesterlund et al., 2005). Glavna karakteristika ćelijskih linija korišćenih u ovom radu je da liče na zrele enterocite na osnovu morfoloških i funkcionalnih karakteristika (Jumarie and Malo, 1991; Lesuffleur et al., 1990). Caco-2 i HT29 su kontinuirana linije heterogenih humanih epitelijalnih ćelija kolorektalnog adenokarcinoma. HT29-MTX je dobijena adaptacijom HT29 ćelijske linije na metotreksat i ima prvenstveno peharaste ćelije ("goblet" ćelije) koja sintetišu mucine (Peruchoa et al., 1981; Lesuffleur et al., 1993). Dobijeni rezultati su pokazali da je adhezija Muc⁻ derivata za sve tri ćelijske linije (NB1, NB4 i NB16) značajno veća od adhezije parentalnog soja BGCG11 ili soja *Lb. rhamnosus* GG. Na osnovu pomenutih rezultata je moguće zaključiti da EPS-CG11 interferira sa interakcijom BGCG11 sa intestinalnim epitelijalnim ćelijama. Na isti zaključak ukazuju i literaturni podaci koji navode da je izogeni EPS-mutant (CMPG5351) soja *Lb. rhamnosus* GG, koji ne produkuje EPS velike molekulske mase bogat galaktozom, već rezidualni EPS male molekulske mase bogat glukozom, imao povećanu adheziju za mukus i za Caco-2 ćelije u odnosu na parentalni soj GG (Lebeer et al., 2009). Slično je pokazano i u soju *Lb. johnsonii* NCC533, koji se nakon delecije operona za biosintezu EPS-a duže održava u mišijem GIT-u. Pretpostavlja se da je razlog bolje adhezije u odsustvu EPS polimera bolja izloženost adhezina bakterija prema eukariotskim ćelijama (Denou et al., 2008).

Kada se poredi adhezija testiranih laktobacila (BGCG11, Muc⁻ derivati i GG soj) za HT29-MTX ćelijsku liniju, uočen je niži stepen adhezije nego u slučaju adhezije za Caco-2 ćelije. Iako HT29-MTX ćelije ekspimiraju sličan proteinski profil kao i Caco-2 ćelije i ćelije intestinalnog epitela čoveka, moguće je da prisustvo sloja glikoproteina (mucina) sprečava interakciju ćelijskih receptora sa bakterijama. Niži stepen adhezije za ovu ćelijsku liniju u odnosu na Caco-2 ćelije je uočen kod *Lb. rhamnosus* GG, kao i kod *B. lactis* Bb12, *B. animalis*, *B. bifidum*, a i kod nekih potencijalnih patogena *E. coli* i *L. monocytogenes* (Laparra and Sanz, 2009). Suprotno ovim podacima, kod *Lb. rhamnosus* DR20, *Lb. acidophilus* HN017 i *B. lactis* DR10 indeks adhezije je bio dva do tri puta veći za HT29-MTX ćelije u odnosu na stepen adhezije za Caco-2 i na HT29 ćelije, ali za pomenute sojeve nije komentarisano da li produkuju EPS (Gopal et al., 2001). Vrlo je interesantan

podatak da su u nedavnoj studiji u toku izučavanja probiotičkog potencijala soja *Lb. rhamnosus* GG i EPS-mutanta CMPG5351, korišćenjem mišijeg *in vivo* modela, istraživači došli do kontradiktornog rezultata u odnosu na *in vitro* analizu. Uočeno je da CMPG5351 mutant kraće opstaje u mišijem GIT-u u odnosu na parentalni GG soj što nije u korelaciji sa većim procentom adhezije mutanta za mukus i za Caco-2 ćelije (Lebeer et al., 2011). Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da EPS soja *Lb. rhamnosus* GG ipak ima zaštitnu ulogu protiv urođenog imunog sistema domaćina ili antimikrobnih molekula koji sintetišu eukariotske ćelije. Iz tih razloga sama uloga EPS molekula ostaje nedovoljno istražena - EPS omotač oko bakterija može da spreči adheziju za enterocite, u njegovom odsustvu drugi površinski molekuli deluju kao adhezini bakterija za GIT, dok s druge strane omogućava bolje preživljavanje. Iz navedenih razloga je bitno koristiti što više modela za analizu efekta EPS polimera koji sigurno mogu da pruže adaptivnu prednost bakteriji proizvođaču EPS-a u određenoj životnoj sredini.

Probiotici svojim prisustvom i aktivnošću vrše modulaciju imunog sistema čoveka indukcijom T-ćelija koje se diferenciraju u Th1, Th2, Th17 ili Treg ćelije (López et al., 2011). Modulacija imunog odgovora domaćina može doprineti poboljšanju njegovog zdravstvenog statusa, mada je taj efekat zavistan od vrste bakterije. Tako na primer, dva probiotska laktobacila istog porekla (majčino mleko) *Lb. fermentum* CECT5716 i *Lb. salivarius* CECT5713 izazivaju različit efekat kod makrofaga kosne srži - prvi se pokazao kao imunostimulator, dok je drugi izazvao anti-inflamatoran efekat (Díaz-Ropero et al., 2007). Posebno je interesantna i studija različitog profila odgovora limfocita periferne krvi u prisustvu 42 različita soja *Lb. plantarum*, gde je pokazano da se odgovor domaćina razlikuje ne samo od vrste do vrste, već i u prisustvu različitih sojeva iste vrste laktobacila (van Hemert et al., 2010).

U ovom radu je praćen efekat EPS-a, kao površinskog molekula, na imuni odgovor domaćina. Rezultati su pokazali da su UV zracima ubijeni soj BGCG11 i Muc⁻ derivati NB1, NB4 i NB16, kao i prečišćeni EPS-CG11 polimer izazvali različit imuni odgovor u limfocitima izolovanim iz periferne krvi (LPK) čoveka. Proliferacija limfocita je bila primećena samo u prisustvu laktobacila, što bi značilo da neki drugi površinski molekuli laktobacila, a ne EPS, indukuju proliferaciju limfocita. Kada se posmatra odnos produkcije različitih citokina u LPK, izgleda da parentalni BGCG11 utiče na povećanje Th2-Treg

odgovora (odnos produkcije IL-10 i IL-12) uključenog u supresivne i imunoregulatorne funkcije kao i na Th17 odgovor (odnos IL-1 β i IL-12) koji je specifično bitan za homeostazu imuniteta mukoze. Iako se čini da pomenuta dva tipa odgovora T-ćelija imaju antagonističke funkcije, poznato je da Th17 i Treg ćelije koriste zajedničke citokine pri signalnim putevima što im daje plastičnost po pitanju polarizacije. Treg mogu da proizvode IL-17 i vrše Th17 funkciju kad su aktivirani u prisustvu proinflamatornih citokina, kao što je IL-1 β (Yang et al., 2008). Dobijeni rezultati sa BGCG11 sojem su u korelaciji sa rezultatima dobijenim sa *B. bifidum* LMG13195 koji pokreće Treg/Th17 polarizaciju ćelija. (López et al., 2011). Najveći broj probiotika koji se koriste u funkcionalnoj hrani vrše indukciju Th1 odgovora, ali je Th17 odgovor kritičan za poboljšanje zaštite domaćina protiv bakterija i gljiva koje nisu efikasno uklonjene kroz Th1 i Th2 odgovor (López et al., 2011). Suprotno u odnosu na BGCG11, Muc⁻ derivati su indukovali inflamatorni (pro-Th1) profil citokina. S obzirom da derivati ne proizvode EPS-CG11 može se smatrati da je prisustvo ovog EPS-a ključno za razliku u imunom odgovoru. S tim u vezi, uočava se dozni efekat EPS-CG11, gde dodat u najvećoj koncentraciji (100 μ g/ml) daje sličan profil imunog odgovora limfocita kao i njegov proizvođač BGCG11. Polimer EPS-CG11 je velike molekulske mase (oko 2×10^6 Da), neutralnog karaktera i uglavnom se sastoji od glukoze i ramnoze sa tragovima galaktoze (Cerning et al., 1994). Moguće je da njegov neutralni karakter doprinosi imunosupresivnom efektu, jer se već zna da kiseli polisaharidi (fosfopolisaharidi) soja *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* indukuju sintezu IFN- γ i IL-1 α u mišijim makrofazima (Kitazawa et al., 1996). Slično je pokazano i u soju *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 gde frakcija EPS-a, koja je po prirodi fosfopolisaharid, indukuje produkciju IFN- γ , dok se imunostimulatorni efekat gubi sa defosforilacijom (Kitazawa et al., 1998; Makino et al., 2006).

Za dalju analizu potencijalnog probiotičkog efekta soja BGCG11, odabrana je HT29-MTX ćelijska linija koja sadrži peharaste ćelije i sintetiše različite mucine, čime se dobija realnija slika interakcije intestinalnog epitela sa bakterijama, s obzirom da je mukus prva barijera za bakterije prilikom interakcije u GIT-u. Analizirano je da li koinkubacija soja BGCG11, derivata NB1, probiotika *Lb. rhamnosus* GG, kao i polimera EPS-GG i EPS-CG11 sa patogenim sojevima dovodi do zaštite eukariotskih ćelija od citotoksičnog efekta

koji mogu da izazovu patogeni. Takođe je meren i nivo sinteze IL-8 u HT29-MTX ćelijama. Poznato je, na primer, da *Listeria monocytogenes*, jedan od najvirulentnih patogena, izaziva meningitis kod novorođenčadi, pa se trudnicama ne preporučuje konzumacija mladih sireva (Genigeorgis et al., 1991). Stoga je *L. monocytogenes* LMG1330, soj poreklom iz sira uključen u analizu efekta na HT29-MTX ćelije. S obzirom da je *L. monocytogenes* intraćelijski patogen, ova bakterija je razvila sistem koji joj omogućava adheziju (uz pomoć internalina) i prodor u epitelijalne ćelije, a sintezom listeriolizina O i fosfolipaze A i B može da izbegne fagocitozu i uspešno nastavi svoj životni ciklus u ćeliji (Robbins et al., 1999). U analizi citotoksičnog efekta na HT29-MTX ćelije, *L. monocytogenes* LMG13305 je jedini patogen koji je značajno lizirao ovu ćelijsku liniju. Interesantno je da je efekat lize ublažen koinkubacijom LMG13305 sa EPS-CG11, dok ćelije laktobacila nisu ublažile citotoksičnost. Do sada je poznato da HT29-MTX ima povećanu ekspresiju *MUC* gena i da listeriolizin O indukuje povećanu sekreciju mucina kao mogući sistem odbrane od invazije *L. monocytogenes* (Liévin-Le Moal., 2005). Moguće je da EPS-CG11 svojim prisustvom formira fizičku barijeru prema HT29-MTX ćelijama i tako oponaša i/ili pojačava efekat mucina, što dovodi do smanjenja stepena lize HT29-MTX.

Osim toga, praćen je i nivo sinteze IL-8 u HT29-MTX ćelijama nakon inkubacije sa patogenima. IL-8 je proinflamatorni citokin, uključen u sistem nespecifičnog imuniteta čija je uloga da privlači neutrofile koji fagocitiraju mikroorganizme ili njihove delove (Vizoso Pinto et al., 2009). Rezultati su pokazali da inkubacija HT29-MTX ćelija sa *Clostridium difficile* LMG21717 i *Cronobacter sakazakii* LMG5740 indukuje najviši relativni nivo produkcije IL-8. Poznato je da *Cl. difficile* ispoljava patogeni efekat nakon antibiotske terapije. Prisustvo antibiotika narušava normalnu crevnu floru što omogućava ekspanziju *Cl. difficile* u GIT-u i dovodi do dijareje, a može i da izazove pseudomembranozni kolitis i ozbiljniju inflamaciju (Vaishnavi, 2010). Stoga je značajan rezultat koji pokazuje da EPS-CG11 a i EPS-GG u velikoj meri smanjuju nivo produkcije IL-8 u koinkubaciji sa *Cl. difficile* LMG21717 u odnosu na vrednosti koje indukuje sam patogen, što ukazuje da u prisustvu EPS polimera dolazi do smanjenja inflamacije koju izaziva patogen. Ujedno, ovo je jedini rezultat gde se vidi efekat smanjenja nivoa IL-8 kada se analizira koinkubacija EPS-CG11 i EPS-GG sa patogenim sojevima na HT29-MTX ćelijama. Poznato je da je

EPS-GG različitog sastava od EPS-CG11, EPS-GG je bogat galaktozom (oko 70%), dok EPS-CG11 ima preko 70% glukoze (Cerning et al., 1994; Lebeer et al., 2009), te izgleda da sastav EPS molekula nije u ovom slučaju presudan za imunosupresivan efekat. Međutim, dok EPS-CG11 u koinkubaciji sa *L. monocytogenes* LMG13305 smanjuje nivo produkcije IL-8, koinkubacija *L. monocytogenes* LMG13305 sa sojem BGCG11 povećava sintezu ovog interleukina u HT29-MTX ćelijama, što bi moglo da znači da neki drugi molekuli sa površine soja BGCG11, pored EPS-CG11 mogu da privuku neutrofile i pomognu uklanjanju *L. monocytogenes* LMG13305 iz GIT-a. BGCG11 i derivat NB1 su povećali produkciju IL-8 u HT29-MTX ćelijama pri koinkubaciji sa *S. enterica* ser. Typhimurium LMG15660, *Shigella sonnei* LMG10473 i *Yersinia enterocolitica* LMG7899, što je i u ovom slučaju najverovatnije posledica odgovora na neki drugi stimulus sa površine laktobacila, koji na ovaj način mogu da pomognu domaćinu u eliminaciji patogena. S obzirom da svi testirani patogeni imaju slične izvore zaraze: *Salmonella* sp. se najčešće prenosi preko svežih pilećih proizvoda kao i mleka, *Shigella* sp. se prenosi preko vode, dok se *Yersinia* sp. može uneti putem termički neobrađene hrane i vode (Doyle and Erickson, 2006; Bagamboula et al., 2002), potencijalna primena soja BGCG11 bi imala smisla ako se unosi u obliku hranljivih proizvoda, gde može da suprimira efekat izazvan prisustvom nekih od patogena (*S. enterica* ser. Typhimurium, *Sh. sonnei* i *Y. enterocolitica*) na način aktivacije nespecifičnog imunog odgovora. U literaturi je pokazano da sojevi *Lb. rhamnosus* GG i *Lb. plantarum* BFE 1685 povećavaju produkciju IL-8 u HT29 ćelijama tretiranim *S. enterica* ser. Typhimurium (Vizoso Pinto et al., 2009). Rezultati prethodno pomenutog rada nisu u korelaciji sa efektom *Lb. rhamnosus* GG na HT29-MTX ćelije, koji je uočen u ovom radu. Međutim, u pomenutom radu je korišćena druga ćelijska linija (HT29), a osim toga ćelije HT29 su bile pretretirane sa TNF- α pre tretmana sa laktobacilima što je najverovatnije dovelo do povećane osetljivosti na prisustvo laktobacila (Vizoso Pinto et al., 2009). Sama inkubacija HT29-MTX sa laktobacilima (BGCG11, NB1 i GG) bez prisustva patogenih sojeva dovodi do značajnog nivoa sinteze IL-8, mada BGCG11 indukuje manju sintezu IL-8 od NB1 derivata ili od GG soja, što može biti posledica efekta prisustva EPS-CG11 koji ima i u ovom slučaju imunosupresivni efekat. Na kraju, interesantan je i podatak da u svim analizama koinkubacije *Lb. rhamnosus* GG sa testiranim patogenima, nije došlo do značajnih

variranja u sintezi IL-8 kod HT29-MTX ćelija, dok odgovor HT29-MTX ćelija varira nakon koinkubacije BGCG11 ili Muc⁻ derivata NB1 sa patogenima. Dobijeni podaci ukazuju da soj BGCG11 može da ispolji različit efekat na GIT-u u odnosu na već okarakterisani probiotički soj *Lb. rhamnosus* GG što je bitno za njegovu dalju potencijalnu primenu kao probiotika nakon dodatnih *in vivo* testova.

Egzopolisaharidi koje proizvodej BMK pokazuju veliku raznovrsnost po svom sastavu, strukturi i veličini molekula (Lebeer et al., 2009). Iako su EPS molekuli raznovrsni i sintetišu ih predstavnici različitih rodova (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* kao i *Bifidobacteria*) generalna organizacija gena uključenih u sintezu ovih polimera je konzervisane strukture. Genetički elementi uključeni u sintezu EPS-a su organizovani u genske operone koji mogu biti locirani na hromozomalnoj ili plazmidnoj DNK (Boels et al., 2001). Biosinteza heteropolisharida počinje intracelularnim formiranjem prekursora, monomera za sintezu ponavljajućih jedinica (UDP-glukoza, UDP-galaktoza, dTDP-ramnoza). Za produkciju EPS-a neophodni su geni koji učestvuju u sklapanju ponavljajućih jedinica, određivanju dužine lanca, polimerizaciji i eksportu kao i u regulaciji procesa (de Vuyst and Degeest, 1999). Do sada je okarakterisan veći broj genskih operona za biosintezu EPS molekula i primećeno je da u okviru pomenute konzervisane strukturne organizacije gena postoje variranja u broju i položaju određenih gena u operonu. Često su prisutni i insercioni elementi u okviru EPS operona, ukazujući na to da usled horizontalnog genetičkog transfera i homologe rekombinacije raste raznovrsnost genetičke informacije, a samim tim i finalnog produkta, EPS molekula, među bakterijama (Lebeer et al., 2009).

Do sad je okarakterisano više različitih gena ili genskih klastera koji učestvuju u biosintezi HePS-a kod BMK. Prvi okarakterisani EPS operon BMK je opisan u soju *Streptococcus thermophilus* Sfi6 veličine 14,5 kb a u čiji sastav ulazi 13 gena (Stingele et al., 1996). EPS operoni u drugim sojevima *St. thermophilus* (NCBF 2393 iMR-1C) su pokazivali veliku homologiju sa okarakterisanim operonom kod *St. thermophilus* Sfi6 (Griffin et al., 1996; Low et al., 1998). Kod svih pomenutih *St. thermophilus* sojeva produkcija EPS-a je kodirana sa hromozomalne DNK. Za razliku od streptokoka, u soju *Lc. lactis* NIZO B40 dobro okarakterisani EPS operon (veličine 12 kb, 14 gena) se nalazio na plazmidnoj DNK, a plazmidna lokalizacija je potvrđena i za 16 drugih *Lc. lactis* sojeva

(van Kranenburg et al., 1999). Interesantno je da je u soju *Lc. lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461 utvrđena hromozomska lokalizacija EPS operona (13,2 kb, 15 gena) čija je funkcija potvrđena inaktivacijom primarne glikoziltransferaze (Dabour and LaPointe, 2005). Što se tiče EPS operona u laktobacilima, uglavnom je konstatovana hromozomalna lokalizacija, jer je do sada jedino u soju *Lb. casei* subsp. *casei* NCIB 4114 pokazano da se čišćenjem plazmida gubi Muc⁺ fenotip, što ukazuje na moguću plazmidnu lokalizaciju. (Vescovo et al., 1989). Četiri soja vrste *Lb. rhamnosus* imaju u hromozomu region veličine 18,5 kb koji kodira 17 gena za EPS biosintezu i uprkos visokoj homologiji gena i organizaciji gena u okviru klastera, produkcija EPS-a u ovim sojevima varira od 100 mg/l u soju *Lb. rhamnosus* ATCC9595 do čak 2350 mg/l u soju *Lb. rhamnosus* RW-9595M (Péant et al., 2005) Takođe, EPS operon probiotičkog soja *Lb. rhamnosus* GG, pokazuje visoku homologiju sa EPS operonom soja *Lb. rhamnosus* ATCC9595, mada soj GG ima originalnu strukturu *eps* gena u okviru operona (Lebeer et al., 2009). Do sada svi pomenuti EPS operoni sojeva *Lb. rhamnosus* su lokalizovani na hromozomalnoj DNK, što je i slučaj kod drugih vrsta laktobacila, kao npr. *Lb. helveticus* NCC2745 koji u svom hromozomu ima 14 kb sekvence sa 11 ORF-a za biosintezu EPS-a, ili *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lf5 koji u regionu veličine 18 kb ima 14 gena koji kodiraju sintezu EPS-a. (Jolly et al., 2002; Lamothe et al., 2002).

Preliminarnom karakterizacijom soja *Lb. paraplantarum* BGCG11 je pokazano da je nakon čišćenja plazmida soj BGCG11 izgubio sposobnost produkcije EPS-CG11, nakon čega je pretpostavljena plazmidna lokalizacija EPS (Kojic et al., 1992). Pored gubitka produkcije EPS-CG11, kolonije Muc⁻ derivata nisu zadržale ni rastegljiv fenotip, ali su i dalje produkovale EPS različitog sastava od EPS-CG11, a nivo produkcije rezidualnog EPS-a je bio i do 10 puta niži nego što je slučaj u parentalnom soju BGCG11 (Cerning et al., 1994). U istom radu je pokazano da soj BGCG11 u minimalnom medijumu sa glukozom produkuje EPS-CG11 koji se sastoji prvenstveno od glukoze (75,7%), ramnoze (20,5%), galaktoze (2,1%) i manoze (1,7%), dok u istim uslovima derivat NB1 produkuje EPS sa glukozom (86,6%), manozom (6,2%), galaktozom (4,1%) i ramnozom (3,1%). Posmatrano kod drugih laktobacila, sposobnost sinteze više od jednog tipa EPS-a nije retka pojava. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFM 2772 produkuje EPS velike molekulske mase ($1,7 \times 10^6$ Da) i manje molekulske mase (4×10^4 Da) koji se razlikuju po tipu veza

među šećerima (Grobben et al., 1997). *Lb. plantarum* EP56, koji je ujedno i prvi predstavnik svoje vrste za koji je izolovan i biohemijski okarakterisan EPS (Tallon et al., 2003), proizvodi dva EPS-a jedan koji se oslobađa u medijum i koji je manje molekulske mase (4×10^4 Da) i drugi koji ostaje nekovalentno ali čvršće vezan uz bakteriju (8×10^5 Da). *Lb. penthosus* LPS26 sintetisuje EPS koji se sastoji od dva tipa EPS-a: EPS A velike molekulske mase ($1,9 \times 10^6$ Da) koji se sastoji od glukoze i ramnoze u odnosu 3:1 i EPS B manje molekulske mase ($3,3 \times 10^4$ Da) sastavljen od glukoze i manoze u odnosu 3:1 (Sánchez et al., 2006). Izogeni EPS-mutant (CMPG5351) soja *Lb. rhamnosus* GG ne proizvodi EPS bogat galaktozom i velike molekulske mase, već proizvodi samo EPS male molekulske mase bogat glukozom (Lebeer et al., 2009). Da bi se potvrdila plazmidna lokalizacija EPS operona soja BGCG11, u ovom radu je izolovana plazmidna DNK prečišćena na gradijentu CsCl. Iz nekoliko postupnih koraka kloniranja i sekvenciranja i potvrđivanja DNK-DNK hibridizacijom da je DNK sekvenca poreklom iz plazmida soja BGCG11 koji nije prisutan u derivatu NB1 (plazmid pCG1), dobijena je sekvenca od preko 26,4 kb u kojoj su okarakterisani otvoreni okviri čitanja, tj. “open reading frames” ili ORF-ovi čiji produkti na aminokiselinskom nivou dele visoku homologiju sa proteinima koji učestvuju u biosintezi EPS-a. Na pCG1 plazmidu u regionu veličine oko 15 kb se nalazi 15 ORF-ova koji su potencijalno uključeni u sintezu EPS-CG11, kao i jedan ORF koji kodira transpozazu (ORF 12). Od svih potencijalnih glizoziltransferaza (ORF 1, 2, 3, 4, 5 i ORF 8), najveću homologiju sa primarnom glikoziltransferazom na aminokiselinskom nivou je pokazao ORF 1, koji je verovatno evolutivno najočuvaniji, kao što je slučaj sa proteinom koji ima istu funkciju kod *Lb. rhamnosus* RW-9595M (Péant et al., 2005). ORF 8 je homolog sa 1,6-galaktoziltransferazom, što bi značilo da može da ima ulogu u dodavanju galaktoze pri formiranju EPS ponavljajućih jedinica EPS-CG11. ORF 6 i 7 su polisaharid-polimeraze i njihova homologija na aminokiselinskom nivou je slična homologiji koju su pokazali *wzx* i *wzy* ORF soja *Lb. rhamnosus* RW-9595M sa okarakterisanim proteinima *St. thermophilus* (Péant et al., 2005). Flipaza (*Wzx*) kao integralni membranski protein, bi trebalo da vrši translokaciju EPS subjedinica kroz citoplazmatičnu membranu, dok polisaharid polimeraza *Wzy* povezuje ponavljajuće jedinice EPS-a i tako formira dugački lanac EPS-a (Lebeer et al., 2009). U slučaju operona EPS-CG11 *Wzy* (ORF 7) nije dao homologiju sa nekom od superfamilija proteina, ali zato

nizvodni ORF 9, 10 i 11 mogu biti uključeni u regulaciju dužine lanca polisaharida, jer pokazuju preko 90% homologije na aminokiselinskom nivou sa proteinima koji imaju tu funkciju kod blisko srodnih *Lb. plantarum* i *Lb. penthosus* vrsta. ORF 9 je homolog sa Wzz regulatorom dužine lanca polisaharida koji ima dva visoko konzervirana potencijalna transmembranska domena u N- i C- terminusu, a lociran je u citoplazmatičnoj membrani (Morona et al., 1995). Iz literature su poznata dva potencijalna mehanizma funkcionisanja Wzy i Wzz proteina. Po jednom, Wzz zajedno sa Wzy vrši polimerizaciju i prenos polimera na WaaL ("lipid A-core" ligazu) gde se nakon ligacije završava polimerizacija. Po drugom modelu Wzz deluje kao šaperon koji olakšava interakciju WaaL sa Wzy i lancem polisaharida (Morona et al., 1995). Moguće je da je ovaj drugi model verovatniji u slučaju biosinteze EPS-CG11 jer Wxy (ORF 7) nije pokazao homologiju sa nekom do sada poznatom superfamilijom proteina, ali deli homologiju sa polisaharid polimerazom. ORF 10 na osnovu homologije sa familijom protein-tirozin autokinaza i ORF 11 kao fosfotirozin-protein fosfataza bi mogli da učestvuju u regulaciji biosinteze EPS-CG11. Ova funkcija pomenutih proteina, je već predložena u prethodnim istraživanjima na *Lb. rhamnosus* GG (Lebeer et al., 2009) i više sojeva *St. pneumoniae* (Bentley et al., 2006) gde vrše translokaciju zrelog EPS molekula kroz peptidoglikan, a kod *St. pneumoniae* možda dovode i do vezivanja za peptidoglikan (jer ova vrsta sintetiše CPS koji ostaje vezan za ćelijski zid), dok se u slučaju BGCG11 EPS-CG11 oslobađa u okolinu bakterije.

ORF 13, 14, 15 i 16, pokazuju preko 96% homologije na aminokiselinskom nivou sa proteinima koji sintetišu dTDP-ramnozu, ti geni se mogu nazvati *rfaACBD* prema homologiji sa genima nekoliko predstavnika vrste *Lb. plantarum*. Na osnovnu analize uzvodne DNK sekvence od ORF 13 (*rfaA* gen) *rfaACBD* geni mogu da imaju jedan zajednički promotor i mogli bi se posmatrati kao mali operon za biosintezu dTDP-ramnoze koja ulazi u sastav EPS-CG11. EPS-CG11 ima neobično veliki procenat ramnoze (20,5%) za razliku od rezidualnog EPS-a derivata NB1 koji ima znatno manje ramnoze (3,1%). U potvrdu ove hipoteze da *rfaACBD* geni učestvuju u biosintezi ramnoze a govori podatak da *rfa* mutanti *St. pneumoniae* i *St. mutans* ne mogu da produkuju polimer (Morona et al., 1997; Tsukioka et al., 1997). Kod *Lb. penthosus* LPS26 koji produkuje dva tipa CPS, takozvani EPS A, koji je velike molekulske mase, ima mnogo veći procenat ramnoze (glukoza i ramnoza su u odnosu 3:1) od EPS B koji je manje molekulske mase i kod koga

je pored glukoze prisutna i manozna, a ne ramnoza (glukoza i manozna u odnosu 3:1), što podseća na razliku koja se vidi u kvalitativnom sastavu EPS molekula u soju BGCG11 i derivata NB1 (Cerning et al., 1994). Interesantan je podatak da je galaktoza u EPS-CG11 prisutna u skoro duplo manjoj procentualnoj količini, kao i glukoza koje ima procentualno manje nego što je slučaj sa galaktozom i glukozom u derivatu NB1 ili u ST derivatima (Cerning et al., 1994). Glukoza 1-fosfat je početni prekursor za sintezu dTDP-ramnoze koja je posredovana produktima *rfbACBD* gena, a moglo bi se zaključiti da će se glukoza 1-fosfat više koristiti za sintezu UDP-glukoze i UDP-galaktoze za rezidualni EPS Muc⁻ derivata ukoliko se ne troši za formiranje dTDP-ramnoze jer *rfbACBD* geni nisu prisutni kod derivata usled nedostatka pCG1 plazmida. Prisustvo *rfbACBD* gena najverovatnije daje specifičnost sastavu a možda i strukturi i fizičko-hemijskim karakteristikama EPS-CG11. Molekulska masa EPS-CG11 je velika (preko 2×10^6 Da), što mu daje karakteristiku velikog viskoziteta, a moguće i da rastegljiv fenotip kolonija BGCG11, koji odsustvuje kod derivata NB1, kao i svih drugih derivata očišćenih od pCG1 plazmida, može takođe biti u vezi sa velikim procentom ramnoze u EPS-u. Već je poznato da na sastav i količinu produkcije EPS-CG11 utiče sastav medijuma, prvenstveno tip šećera koji se koristi za gajenje i uslovi kultivacije. Rastegljiv fenotip se gubi gajenjem BGCG11 u medijumu sa fruktozom kao jedinim izvorom šećera. Uticaj fruktoze na gubitak produkcije produkcije EPS visoke molekulske mase je primećeno kod *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFM 2772, mada soj zadržava produkciju EPS-a male molekulske mase (Grobben et al., 1997). Slično je pokazano u soju *Lb. penthosus* LPS26, u medijumu sa fruktozom dolazi do gubitka produkcije EPS A koji je takođe visoke molekulske mase (Sánchez et al., 2006). Moguće je da prisustvo fruktoze kao jedinog izvora ugljenih hidrata u medijumu za rast BGCG11 dovodi do produkcije nekih drugih monomera, jer je za sintezu dTDP-ramnoze početni molekul glukoza 1-fosfat (Boels, 2002). Tako npr., od fruktoze 6-fosfata može da se sintetiše GDP-fukoza, koja nije prisutna u EPS-CG11 niti u EPS-u koji produkuju Muc⁻ derivati ukoliko su gajeni u medijumu sa glukozom kao jedinim izvorom šećera, ali se fukoza sintetiše ako se BGCG11 i derivati gaje u laktozi (Cerning et al., 1994). Povećana produkcija EPS-CG11 je primećena ukoliko se soj gaji na nižoj temperaturi od optimalne, što je takođe primećeno u sojevima *Lb. plantarum* EP56 i *Lb. penthosus* LPS26 (Tallon et al., 2003; Sánchez et al., 2006). Po

jednom od predloženih mehanizama, na nižoj temperaturi postoji više izoprenoidnih glikozil lipid nosača koji se ne koriste za sintezu ćelijskog zida, jer bakterije sporije rastu, tako da su ovi molekuli na raspolaganju za biosintezu EPS-a (Sutherland, 1972).

U produžetku pomenutih gena u okviru EPS-CG11 operona postoje još četiri gena od kojih su ORF 17 i ORF 18 homologni sa glikoziltransferazama koje možda ne utiču na biosintezu EPS-a (do sada nisu nađeni u EPS operonima) već su uključeni u opšti metabolizam bakterije ili možda u biosintezu bakterijske membrane. ORF 19 i ORF 20 kodiraju transpozaze koje su jedine u suprotnoj orijentaciji u odnosu na sve *eps* gene. Prisustvo ovih transpozaza i transpozaze u okviru ORF 12 dovodi do zaključka da su *eps* geni, a pogotovu geni potencijalno uključeni u biosintezu dTDP-ramnoze najverovatnije horizontalnim transferom i homologom rekombinacijom dospeli na sadašnju poziciju. Do sada je pokazano da su *rfaACBD* geni retko prisutni u EPS operonima, potvrđeno im je prisustvo u slučaju *Lb. rhamnosus* RW-9595M koji produkuje EPS sa neobično visokim sadržajem ramnoze, dok soj *Lb. rhamnosus* GG ima aktivne *rfaACBD* gene van EPS operona jer je *rmlA* prirodnim putem inaktiviran sa insercionim elementom (Péant et al., 2005; Lebeer et al., 2009).

Pomenuti sojevi *Lb. plantarum* EP56 i *Lb. pentosus* LPS26 koji produkuju više tipova EPS molekula, nemaju do sada okarakterisan EPS operon niti se pominje moguća lokalizacija ovih gena. Sa druge strane, poslednjih godina je sekvenciranje genoma više vrsta laktobacila srodnih soju BGCG11 razotkrilo sekvence EPS operona sojeva *Lb. plantarum* (WCFS1, ATCC 14917 i JDM1) kao i *Lb. pentosus* (MP-10 i IG1). Interesantno je da nije redak slučaj da u genomske sekvenci postoji više *eps* gena ili čak operona koji variraju po broju i položaju gena, ali je bitno napomenuti da kod pomenutih sojeva za sada nema podataka o strukturalnoj ni biohemijskoj analizi EPS molekula, čak su autori za soj *Lb. plantarum* WCFS1 napomenuli da ne produkuje EPS jer mu nedostaju regulatorni geni (Cohen et al., 2006). Ipak, treba sa rezervom prihvatiti sve informacije koje mogu da se zaključe na osnovu homologije sa sekvenciranim genomima, jer su moguće greške pri sekvenciranju i bioinformatičkim analizama dobijenih sekvenci. Tako je pokazano da je u genomu soja *Lb. plantarum* WCFS1, koji je sekvenciran 2001. godine, nakon ponovnog sekvenciranja uvedeno 116 nukleotidnih korekcija i poboljšana predikcija funkcije za skoro 1200 proteina (Siezen et al., 2012). Zato ostaje zadatak za budući rad da se pokaže

funkcija sekvenciranog operona EPS-CG11. Neophodno je transformisati derivat NB1 sa kompletnim EPS operonom, ili delom koji sadrži *rfbACBD* gene, da bi se povratila sinteza EPS-CG11 i rastegljivi fenotip bakterija, ili inaktivacijom jednog ili više *rfbACBD* gena sa pCG1 plazmida pokazati da su zaslužni za prisustvo ramnoze u EPS-CG11 i za rastegljivi fenotip soja BGCG11.

Treba naglasiti da rezultati karakterizacije potencijalnog EPS operona i njegova lokalizacija imaju izuzetno veliki doprinos, jer je po prvi put okarakterisan potencijalni EPS operon kod vrste *Lb. paraplantarum*, a posebno je značajno da se EPS operon za nalazi na plazmidu, što je za laktobacile do sad konstatovano samo u već pomenutom soju *Lb. casei* subsp. *casei* NCIB 4114 (Vescovo et al., 1989) ali kod njega za sada još uvek nije funkcionalno okarakterisan EPS operon.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata izloženih u ovom radu mogu se doneti sledeći zaključci:

1. Sojevi iz BG kolekcije korišćeni u ovom radu koji ispoljavaju autoagregaciju i odabrani sojevi koji ne poseduju sposobnost autoagregacije su na osnovu homologije dela sekvence gena za 16S rRNK svrstani u grupu *Lactobacillus casei*, izuzev soja BGDU4-71 koji je determinisan kao *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. BGCG11, proizvođač EPS-CG11 polimera, je determinisan AFLP metodom kao *Lactobacillus paraplantarum*.
2. Brzina autoagregacije i oblik agregata je varirao u analiziranim sojevima, pri čemu su sojevi BGSJ2-8, BGDP1-84 i BGNJ1-6 najbrže formirali agregate.
3. Autoagregacija se gubila intenzivnim pranjem u bidestilovanoj vodi u svim analiziranim sojevima, izuzev u soju BGDP1-84, ukazujući da je veoma značajna uloga jona u ispoljavanju agregacionog fenotipa kod većine sojeva. Pokazano je da tretman proteinazom K utiče na gubitak sposobnosti agregacije, što ukazuje da su faktori autoagregacije proteinske prirode.
4. *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 je formirao koagregate sa sojevima *Listeria innocua* ATCC33090, *Escherichia coli* ATCC25922 i *Salmonella enterica* ser. Typhimurium TR251. Koagregacija je takođe narušena tretmanom proteinazom K, što ukazuje da su molekuli koji indukuju sposobnost koagregacije proteinske prirode.
5. Svi analizirani sojevi koji imaju sposobnost autoagregacije su pokazali visoku hidrofobnost ćelijske površine, najverovatnije usled pokrivenosti ćelija agregacionim proteinima, dok je u sojevima (kao i derivatu BGSJ2-81) koji ne agregiraju površina ćelija hidrofilna.
6. Soj *Lb. paraplantarum* BGCG11 i Muc⁻ derivati NB1, NB4 i NB16, resuspendovani u 10% obranom mleku, preživljavaju (1-2%) simulirani prolazak kroz gastrointestinalni trakt (GIT).
7. Rezultati su pokazali da je EPS-CG11 tokom prolaska kroz simulirane uslove GIT-a rezistentan na aktivnost niskog pH i enzima GIT-a, tj. molekulska masa i količina su ostale nepromenjene.

8. EPS-CG11 dovodi do smanjene adhezije za ćelijske linije jer je testiranjem adhezije sojeva BGCG11 i *Lb. rhamnosus* GG za intestinalne epitelijalne ćelijske linije (Caco-2, HT29 i HT29-MTX) pokazan sličan procenat adhezije oba soja, dok je adhezija Muc⁻ derivata soja BGCG11 (NB1, NB4 i NB16), za sve tri ćelijske linije, značajnije povećana. Svi testirani laktobacili su pokazali najmanji procenat adhezije za HT29-MTX ćelijsku liniju.
9. Limfociti periferne krvi dobrovoljnih davaoca su proliferisali u prisustvu mrtvih ćelija laktobacila (BGCG11 i Muc⁻ derivata NB1, NB4 i NB16) dok EPS-CG11 nije uticao na proliferaciju limfocita, čak ni pri maksimalnoj korišćenoj koncentraciji od 100 µg/ml.
10. Prisustvo laktobacila (BGCG11 i Muc⁻ derivata NB1, NB4 i NB16) i rastućih koncentracija EPS-CG11 različito utiče na produkciju citokina u limfocitima periferne krvi. BGCG11 i Muc⁻ derivati NB1, NB4 i NB16 indukuju značajno viši nivo produkcije svih testiranih citokina izuzev IL-17. Soj BGCG11 indukuje značajno nižu produkciju IL-12 u poređenju sa Muc⁻ derivatima NB1, NB4 i NB16, dok razlike u nivou produkcije ostalih citokina nisu uočene. Za razliku od ćelija laktobacila, EPS-CG11 je indukovao povećanu produkciju samo IL-17, čija produkcija nije indukovana u prisustvu ćelija laktobacila.
11. Uopšteno, može se reći da BGCG11 indukuje antiinflamatorni i pro-Th17 tip imunog odgovora, dok Muc⁻ derivati NB1, NB4 i NB16 ispoljavaju inflamatorni odgovor. Prečišćeni EPS-CG11 je u koncentraciji od 100 µg/ml ispoljio efekat kao i parentalni BGCG11.
12. EPS-CG11 smanjuje nivo citotoksičnog efekta *L. monocytogenes* LMG13305 u HT29-MTX ćelijama, što je pokazano koinkubacijom *L. monocytogenes* LMG13305 sa EPS-CG11.
13. Nivo produkcije IL-8 u HT29-MTX ćelijama nakon koinkubacije patogenih sojeva sa laktobacilima (BGCG11, Muc⁻ derivat NB1 i *Lb. rhamnosus* GG) ili EPS polimerima (EPS-CG11 ili EPS-GG) je bio različit u odnosu na inkubaciju sa patogenim sojevima. BGCG11 i NB1 značajno povećavaju produkciju IL-8 u prisustvu *S. enterica* ser. Thyphymurium LMG15660, *Shigella sonnei* LMG10473 i *Yersinia enterocolitica* LMG7899. Samo je BGCG11 značajno

povećao produkciju IL-8 u koinkubaciji sa *L. monocytogenes* LMG13305. EPS-CG11 je snizio nivo produkcije IL-8 u koinkubaciji sa *L. monocytogenes* LMG13305, a oba tipa EPS molekula (EPS-CG11 i EPS-GG) su značajno smanjila nivo produkcije IL-8 u koinkubaciji sa *Clostridium difficile* LMG21717. Generalno se može zaključiti da različiti molekuli sa površine patogena, i laktobacila modifikuju nespecifični imuni odgovor HT29-MTX ćelijske linije, dok prisustvo prečišćenih EPS molekula uglavnom stišavaju taj odgovor. Razlikuje se efekat EPS-CG11 i EPS-GG polimera, kao i *Lb. rhamnosus* GG u odnosu na BGCG11.

14. Na plazmidu pCG1 koji je prisutan u parentalnom soju BGCG11, a nedostaje kod Muc⁻ derivata, lokalizovan je operon za sintezu EPS-CG11. U regionu od oko 15 kb se nalazi 15 ORF-ova koji su potencijalno uključeni u sintezu EPS-CG11, kao i transpozaza (ORF 12). Ostali ORF-ovi su okarakterisani na osnovu homologije aminokiselinske sekvence kao: primarna glikoziltransferaza (ORF1) glikoziltransferaze (ORF 2, 3, 4, 5 i ORF 8), polisaharid polimeraze (ORF 6 i 7), regulatori dužine lanca polisaharida (ORF 9, 10 i 11), regulatori biosinteze EPS-a (ORF 10 i 11). Nizvodno od pomenutih ORF-ova je transpozaza, dok ORF 13, 14, 15 i 16, daju homologiju na aminokiselinskom nivou sa proteinima koji sintetišu dTDP-ramnozu, ti geni (*rfbACBD*) na osnovnu analize uzvodne DNK sekvence od ORF 13 (*rfbA* gen) mogu da imaju jedan zajednički promotor i mogli bi se posmatrati kao dodatni operon za biosintezu dTDP-ramnoze koja ulazi u sastav EPS-CG11.

7. LITERATURA

- Adolfsson, O., Meydani, S.N., Russell, R.M. (2004): Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr*, 80: 245-256.
- Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A.M.A., Takagi, A., Koga, Y. (1998): Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am J Gastroenterol*, 93: 2097-2101.
- Aleljung, P., Shen, W., Rozalska, B., Hellman, U., Ljungh, A. Wadstrom, T. (1994): Purification of collagen-binding proteins of *Lactobacillus reuteri* NCIB 11951. *Curr Microbiol*, 28: 231-236.
- Anderson, D.G. McKay, L.L. (1983): Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl Environ Microbiol*, 46: 549-552.
- Andersson, H., Asp, N-G., Bruce, A., Roos, S., Wadstrom, T., Wold, A.E. (2001): Health effects of probiotics and prebiotics: A literature review on human studies. *Scand J Nutr*, 45: 58-75
- Antikainen, J., Anton, L., Sillanpaa, J. Korhonen, T.K. (2002): Domains in the S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly. *Mol Microbiol*, 46: 381-394.
- Artis, D. (2008): Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol*, 8: 411-420.
- Aslim, B., Onal, D., Beyatli, Y. (2007): Factors influencing autoaggregation and aggregation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolated from handmade yogurt. *J Food Prot*, 70: 223-227.
- Aso, Y., Akaza, H., Kotake, T., Tsukamoto, T., Imai, K., Naito, S. (1995): Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. The BLP Study Group *Eur Urol*, 27: 104-109.
- Avall-Jaaskelainen, S., Palva, A. (2005): *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol. Rev*, 29: 511-529.
- Axelsson, L. T. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S., Ouwehand, A., von Wright, A., *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and functional aspects*. New York, Marcel Dekker Inc.: 1-66.
- Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I. (2005): Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307: 1915-1920.
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M., Debevere, J. (2002): Acid tolerance of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *J Appl Microbiol*, 93: 479-486.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Gutierrez, E.G. (1994): Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci Lett*, 179: 53-56.

- Bath, K., Roos, S., Wall, T., Jonsson, H. (2005): The cell surface of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 highlighted by identification of 126 extracellular proteins from the genome sequence. *FEMS Microbiol Lett*, 253: 75-82.
- Bauman RW. 2004. *Microbiology*. Pearson -Benjamin Cummings. San Francisco. USA.
- Bentley, S.D., Aanensen, D.M., Mavroidi, A., Saunders, D., Rabbinowitsch, E., Collins, M., Donohoe, K., Harris, D., Murphy, L., Quail, M.A., Samuel, G., Skovsted, I.C., Kalltoft, M.S., Barrell, B., Reeves, P.R., Parkhill, J., Spratt, B.G. (2006): Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet*, 2:e31.
- Bergonzelli, G.E., Granato, D., Pridmore, R.D., Marvin-Guy, L.F., Donnicola, D. Corthesy-Theulaz, I.E. (2006): GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 74: 425-434.
- Biller, J.A., Katz, A.J., Flores, A.F., Buie, T.M., Gorbach, S.L. (1995): Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 21: 224-226.
- Bleau, C., Monges, A., Rashidan, K., Lverdure, J.P., Lacroix, M., van Clasteren, M.R., Millette, M., Savard, R., Lamontagne, L. (2010): Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages. *J Appl Microbiol*, 108: 666-675.
- Boels, I.C., Ramos, A., Kleerebezem, M., de Vos, W.M. (2001): Functional Analysis of the *Lactococcus lactis galU* and *galE* genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 67: 3033-3040.
- Boels, I.C. (2002): Metabolic engineering of exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis*. Thesis Wageningen University, the Netherlands.
- Boris, S., Suarez, J.E., Vazquez, F. Barbes, C. (1998): Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect Immunity*, 66: 1985-1989.
- Broadbent, J.R., McMahon, D.J., Welker, D.L., Oberg, C.J., Moineau, S. (2003): Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. *J Dairy Sci*, 86: 407-423.
- Brynskov, J., Foegh, P., Pedersen, G., Ellervik, C., Kirkegaard, T., Bingham, A., Saermark, T. (2002): Tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 51: 37-43.
- Buck, B.L., Altermann, E., Svingerud, T. Klaenhammer, T.R. (2005): Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol*, 71: 8344-8351.
- Burns, P., Reinheimer, J., Vinderola, G. (2011a): Impact of bile salt adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 200 on its interaction capacity with the gut. *Res Microbiol*, 162: 782-790.

- Burns, P., Vinderola, G., Reinheimer, J., Cuesta, I., de Los Reyes-Gavilán, C.G., Ruas-Madiedo, P. (2011b): Technological characterization and survival of the exopolysaccharide-producing strain *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 193 and its bile-resistant derivative 193+ in simulated gastric and intestinal juices. *J Dairy Res*, 78: 357-364.
- Canducci, F., Armuzzi, A., Cremonini, F., Cammarota, G., Bartolozzi, F., Pola, P., Gasbarrini, G., Gasbarrini, A., (2000): A lyophilized and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increases *Helicobacter pylori* eradication rates. *Aliment Pharmacol Ther*, 14: 1625-1629.
- Cerning, J., Renard, C.M.G.C., Thibault, J.F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M. Topisirovic, L. (1994): Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl Environ Microbiol*, 60: 3914-3919.
- Cesena, C., Morelli, L., Alander, M., Siljander, T., Tuomola, E., Salminen, S., Mattila-Sandholm, T., Vilpponen-Salmela, T., von Wright, A. (2001): *Lactobacillus crispatus* and its nonaggregating mutant in human colonization trials. *J Dairy Sci*. 84: 1001-1010.
- Chabot, S., Yu, H.L., de Léséleuc, L., Cloutier, D., van Calsteren, M.R., Lessard, M., Roy, D., Lacroix, M., Oth, D. (2001): Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse culture immunocompetent cells, and INF- γ in mouse splenocytes. *Lait*, 81: 683-697.
- Chinen, T., Rudensky, A.Y. (2012): The effects of commensal microbiota on immune cell subsets and inflammatory responses. *Immunol Rev*, 245: 35-55.
- Ciric, D., Kojic, M., Levata, M., Topisirovic, L., Banina, A., (1990): Exocellular polysaccharide production by natural isolates of lactobacilli. *FEMS Microbiol Rev*, 87: P76.
- Claesson, M.J., Li, Y., Leahy, S., Canchaya, C., van Pijkeren, J.P., Cerdeño-Tárraga, A.M., Parkhill, J., Flynn, S., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K., Higgins, D., Shanahan, F., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., O'Toole, P.W. (2006): Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 6718-6723.
- Coconnier, M.H., Bernet, M.F., Kerneis, S., Chauviere, G., Fourniat, J., Servin, A.L. (1993): Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiol Lett*, 110: 299-306.
- Coconnier, M.H., Lievin, V., Bernet-Camard, M.F., Hudault, S., Servin, A.L. (1997): Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 1046-1052.
- Cohen, D.P., Renes, J., Bouwman, F.G., Zoetendal, E.G., Mariman, E., de Vos, W.M., Vaughan, E.E. (2006): Proteomic analysis of log to stationary growth phase *Lactobacillus plantarum* cells and a 2-DE database. *Proteomics*, 6: 6485-6493.

- Collado, C., Surono, I., Meriluoto, J., Salminen, S. (2007): Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interaction with pathogens. *J Food Sci*, 72: 89-93.
- Collins, J.K., Thornton, G., O'Sullivan, G.O. (1998): Selection of probiotic strains for human applications. *Int Dairy J*, 8: 487-490.
- Connell, I., Agace, W., Klemm, P., Schembri, M., Mårild, S., Svanborg, C. (1996): Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 9827-9832.
- Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P. (2007): Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol Ther*, 26: 767-778.
- Dabour, N., LaPointe, G. (2005): Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Appl Environ Microbiol*, 71: 7414-7425.
- de los Reyes-Gavilán, C.G., Suárez, A., Fernández-García, M., Margolles, A., Gueimonde, M., Ruas-Madiedo, P. (2011): Adhesion of bile-adapted *Bifidobacterium* strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated *in vitro* using human gastric and duodenal juices. *Res Microbiol*, 162: 514-519.
- de Roos, N.M., Katan, M.B. (2000): Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: A review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr*, 71: 405-411.
- de Vuyst, L., de Vin, F., Vaningelgem, F., Degeest, V. (2001): Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J*, 11: 687-707.
- de Vuyst, L., Degeest, B. (1999): Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 23: 153-177.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., Hols, P. (1999): The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76:159-184.
- Denou, E., Pridmore, R.D., Berger, B., Panoff, J.M., Arigoni, F., Brüssow, H. (2008): Identification of genes associated with the long-gut-persistence phenotype of the probiotic *Lactobacillus johnsonii* strain NCC533 using a combination of genomic and transcriptome analysis. *J Bacteriol*, 190: 3161-3168.
- Díaz-Ropero, M.P., Martín, R., Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Rodríguez, J.M., Xaus, J., Olivares, M. (2007): Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol*, 102: 337-343.
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E.K., Lanctôt, K.L. (2010): A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*, 67: 446-457.
- Doyle, M.P., Erickson, M.C. (2006): Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poult Sci*, 85: 960-973.
- Duboc, P., Mollet, B. (2001): Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int Dairy J*, 11: 759-768.

- EFSA. (2009): Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed (2009 update). EFSA Journal 7: 1-92.
- El-Nezami, H., Mykkänen, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. (2000): Ability of *Lactobacillus* and *Probionibacterium* strains to remove aflatoxin B1 from chicken duodenum. J Food Protect, 63: 549-552.
- FAO-WHO (2006): Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutritional paper No. 85: 1-50 (ISBN 92-5-105513-0).
- Faye, T., Tamburello, A., Vegarud, G.E., Skeie, S. (2012): Survival of lactic acid bacteria from fermented milks in an in vitro digestion model exploiting sequential incubation in human gastric and duodenum juice. J Dairy Sci, 95: 558-566.
- Felley, C-P., Corthesy-Theulaz, I., Rivero, J.L., Sipponene, P., Kaufmann, B.P., Wiesel, P.H., Brassart, D., Pfeifer, A., Blum, A.L., Michetti, P. (2001): Favourable effect of acidified milk (LC-1) on *Helicobacter gastritis* in man. Eur J Gastroenterol Hepatol, 13: 25-29.
- Gajic, O., Kojic, M., Banina, A., Topisirovic, L. (1999): Characterization of natural isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5, a strain producing two bacteriocins, cell wall-associated proteinase and showing clumping phenotype. Arch Biol Sci, 51: 69-78.
- Genigeorgis, C., Carniciu, M., Dutulescu, D., Farver, T.B. (1991): Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 to 30 degrees C. J Food Prot, 54: 662-668.
- Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., Gill, H.S. (2001): *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. Int Food Microbiol, 67: 207-216.
- Gorbach, S.L., Chang, T.W., Goldin, B. (1987): Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. Lancet, 26: 1519.
- Granato, D., Perotti, F., Masserey, I., Rouvet, M., Golliard, M., Servin, A. Brassart, D. (1999): Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. Appl Environ Microbiol 65: 1071-1077.
- Granato, D., Bergonzelli, G.E., Pridmore, R.D., Marvin, L., Rouvet, M. Corthesy-Theulaz, I.E. (2004): Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. Infect Immun, 72: 2160-2169.
- Griffin, A.M., Morris, V.J., Gasson, M.J. (1996): The *cpsABCDE* genes involved in polysaccharide production in *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* strain NCFM 2393. Gene, 183: 23-27.
- Grobben, G.J., van Casteren, W.H.M., Schols, H.A., Oosterveld, A., Sala, G., Smith, M.R. Sikkema, J., de Bont, J.A.M. (1997): Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in continuous culture on glucose and fructose, Appl Microbiol Biotechnol, 48: 516-521.

- Guandalini, S., Pensabene, L., Zikri, M.A., Dias, J.A., Casali, L.G., Hoekstra, H., Kolacek, S., Massar, K., Micetic-Turk, D., Papadopoulou, A., de Sousa, J.S., Sandhu, B., Szajewska, H., Weizman, Z. (2000): *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: A multicenter European trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 30: 54-60.
- Guarner, F., Schaafsma, G.J. (1998): Probiotics. *Int J Food Microbiol*, 39: 237-238.
- Gupta, P., Andrew, H., Kirschner, B.S., Guandalini, S. (2000): Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 31: 453-457.
- Hanahan, D. (1983): Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol*, 166: 557-580.
- Hanahan, D. (1985): DNA Cloning (Glover, D. M., ed.) IRL Press, Oxford, 1, 109.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Weaver, C.T. (2005): Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 6: 1123-1132.
- Havenaar, R., Huis in't Veld, J.H.J. (1992): Probiotics: A general view. In: Wood BJB: The Lactic Acid Bacteria, Vol. 1: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease, Chapman & Hall, New York, NY: 209-224.
- Holzapel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J.H.J. (1998): Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol*, 41: 85-101.
- Hopwood, D.A., Bibb, J.M., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, K.M., Smith, C.P., Ward, J.M. Schrepf, H. (1985): Genetic manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Hudault S, Liévin V, Bernet-Camard MF, Servin AL (1997): Antagonistic activity *in vitro* and *in vivo* exerted by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* infection. *Appl Environ Microbiol*, 63: 513-518.
- Hynonen, U., Westerlund-Wikstrom, B., Palva, A. Korhonen, T.K. (2002): Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *J Bacteriol*, 184: 3360-3367.
- Isolauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T., Sillanaukee, P., Koivula, T. (1991): A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp. strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics*, 88: 90-97.
- Isolauri, E., Arvola, T., Sutas, Y., Moilanen, E., Salminen, S. (2000): Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy*, 30: 1604-1610.
- Jankovic, I., Ventura, M., Meylan, V., Rouvet, M., Elli, M., Zink, R. (2003): Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2. *J Bacteriol*, 185: 3288-3296.
- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., Axelsson, L. (2012): *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, 153: 216-222.

- Johnson-Henry, K.C., Hagen, K.E., Gordonpour, M., Tompkins, T.A., Sherman, P.M. (2007): Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cell Microbiol*, 9: 356-367.
- Jolly, L., Newell, J., Porcelli, I., Vincent, S.J., Stingle, F. (2002): *Lactobacillus helveticus* glycosyltransferases: from genes to carbohydrate synthesis. *Glycobiology*, 12: 319-327.
- Jovicic, B., Begovic, J., Lozo, J., Topisirovic, L., Kojic, M. (2009): Dynamic of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Arch Biol Sci*, 61: 159-165.
- Jumarie, C. and Malo, C. (1991): Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation *in vitro*. *J Cell Physiol* 149: 24-33.
- Kabir, A.M., Aiba, Y., Takagi, A., Kamiya, S., Miwa, T., Koga, Y. (1997): Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut*, 41: 49-55.
- Kalliomaki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., Isolauri, E. (2001): Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 357: 1076-1079.
- Kandler, O. Weiss, N. (1986): Regular, non-sporing Gram-positive rods, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2 (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt, eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, pp 1208-1234.
- Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., von Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P., Satokari, R., Vesterlund, S., Hendrickx, A.P., Lebeer, S., De Keersmaecker, S.C., Vanderleyden, J., Hämäläinen, T., Laukkanen, S., Salovuori, N., Ritari, J., Alatalo, E., Korpela, R., Mattila-Sandholm, T., Lassig, A., Hatakka, K., Kinnunen, K.T., Karjalainen, H., Saxelin, M., Laakso, K., Surakka, A., Palva, A., Salusjärvi, T., Auvinen, P., de Vos, W.M. (2009): Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 17193–17198.
- Kawaguchi, M., Kokubu, F., Fujita, J., Huang, S.K., Hizawa, N. (2009): Role of interleukin-17F in asthma. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 8: 383-389.
- Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Saito, T., Kaneko, T., Itoh, T. (1998): Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Int J Food Microbiol*, 40:169-175.
- Kitazawa, H., Itoh, T., Tomioka, Y., Mizugaki, M., Yamaguchi, T. (1996): Induction of IFN-1/ and IL-1 a production in macrophages stimulated with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* *Food Microbiol*, 31: 99-106.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W., Stiekema, W., Lankhorst, R.M., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B.,

- de Vos, W.M., Siezen, R.J. (2003): Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Proc Natl Acad Sci USA, 100: 1990-1995.
- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R.J., Bron, P.A. (2010): The extracellular biology of the lactobacilli. FEMS Microbiol Rev, 34: 199-230.
- Klein, G., Pack, A., Bonnaparte, C., Reuter, G. (1998): Taxonomy and physiology of lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol, 41: 103-125.
- Koboziev, I., Karlsson, F., Grisham, M.B. (2010): Gut-associated lymphoid tissue, T cell trafficking, and chronic intestinal inflammation. Ann N Y Acad Sci, 1207: E86-93.
- Köhidai, L., Csaba, G. (1998): Chemotaxis and chemotactic selection induced with cytokines (IL-8, RANTES and TNF-alpha) in the unicellular *Tetrahymena pyriformis*. Cytokine, 10: 481-486.
- Kojic, M., Vujcic, M. Banina, A., Cocconcelli, P., Cerning, J. Topisirovic, L. (1992): Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese. Appl Environ Microbiol 58: 4086-4088.
- Kojic, M., Jovicic, B., Strahinic, I., Begovic, J., Lozo, J., Veljovic, K., Topisirovic, L. (2011): Cloning and expression of a novel lactococcal aggregation factor from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1. 11:265-274.
- Kolenbrander, P.E. (2000): Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. Annu Rev Microbiol, 54:413-439.
- Kuby, J., Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A. (2007): Kuby immunology. W.H. Freeman. San Francisco, USA pp. 396.
- Lamothe, G.T., Jolly, L., Mollet, B., Stingle, F. (2002): Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Arch Microbiol, 178: 218-228.
- Laparra, J.M., Sanz, Y. (2009): Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. Lett Appl Microbiol, 49: 695-701.
- Laws, A.P., Marshall, V.M. (2001): The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. Int Dairy J, 11: 709-722.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C. (2008): Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. Microbiol Mol Biol Rev, 72: 728-764.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L., Francius, G., Schoofs, G., Lambrechts, I., Dufrière, Y., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C. (2009): Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. Appl Environ Microbiol, 75: 3554-3563.
- Lebeer, S., Claes, I.J.J., Verhoeven, T.L.A., Vanderleyden, J., de Keersmaechker, S.C.J. (2011): Exopolysaccharides of *Lactobacillus rhamnosus* GG form a protective shield against innate immune factors in the intestine. Microb Biotechnol, 4: 368-374.

- Leppkes, M., Becker, C., Ivanov, I.I., Hirth, S., Wirtz, S., Neufert, C., Pouly, S., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Becher, B., Littman, D.R., Neurath, M.F. (2009): RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology*, 136: 257-267.
- Leroy, F. de Vuyst, L. (2004): Lactic acid bacteria as functional starter cultures for food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol*, 15: 67-78.
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E. and Zweibaum, A. (1990): Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon-carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar and mucus-secreting cells. *Cancer Res*, 50: 6334-6343.
- Lesuffleur, T., Porchet, N., Aubert, J.P., Swallow, D., Gum, J.R., Kim, Y.S., Real, F.X., Zweibaum, A. (1993): Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *J Cell Sci*, 106: 771-783.
- Liévin-Le Moal, V., Servin A.L., Coconnier-Polter, M.H. (2005): The increase in mucin exocytosis and the upregulation of MUC genes encoding for membrane-bound mucins induced by the thiol-activated exotoxin listeriolysin O is a host cell defence response that inhibits the cell-entry of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol*. 7: 1035-1048.
- Lo Curto, A., Pitino, I., Mandalari, G., Dainty, J.R., Faulks, R.M., John Wickham, M.S. (2011): Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an in vitro gastric model of digestion. *Food Microbiol*, 28: 1359-1366.
- López, P., González-Rodríguez, I., Gueimonde, M., Margolles, A., Suárez, A. (2011): Immune response to *Bifidobacterium bifidum* strains supports Treg/Th17 plasticity. *PLoS One* 6: e24776.
- Low, D., Ahlgren, J.A., Horne, D., McMahon, D.J., Oberg, C.J., Broadbent, J.R. (1998): Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Appl Environ Microbiol*, 64: 2147-2151.
- Lozo, J., Jovic, B., Kojic, M., Dalgalarondo, M., Chobert, J.M., Haertlé, T., Topisirovic, L. (2007): Molecular characterization of a novel bacteriocin and an unusually large aggregation factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, a natural isolate from homemade cheese. *Curr Microbiol*, 55:266-271.
- MacKenzie, D.A., Jeffers, F., Parker, M.L., Vibert-Vallet, A., Bongaerts, R.J., Roos, S., Walter, J., Juge, N. (2010): Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology*, 156: 3368-3378.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (1997): *Brock Biology of Microorganisms*. 8th ed. Prentice Hall International Ltd., London, UK. Baker, P.R. 1978.
- Maeda, H., Zhu, X., Suzuki, S., Suzuki, K., Kitamura, S. (2004): Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B(T). *J Agric Food Chem*, 52: 5533-5538.

- Majamaa, H., Isolauri, E. (1996): Evaluation of the gut mucosal barrier: Evidence for increased antigen transfer in children with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol*, 97: 985-990.
- Majamaa, H., Isolauri, E. (1997): Probiotics: A novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 99: 179-185.
- Makino, S., Ikegami, S., Kano, H., Sashihara, T., Sugano, H., Horiuchi, H., Saito, T., Oda, M. (2006): Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *J Dairy Sci*, 89: 2873-2881.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- March, C.J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C.S., Kronheim, S.R., Grabstein, K. (1985): Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature*, 315: 641-647.
- Marraffini, L.A., Dedent, A.C., Schneewind, O. (2006): Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Grampositive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70: 192-221.
- Martín, R., Sánchez, B., Suárez, J.E., Urdaci, M.C. (2012): Characterization of the adherence properties of human lactobacilli strains to be used as vaginal probiotics. *FEMS Microbiol Lett*, 328: 166-173.
- Mathara, J.M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C., Kutima, P.M., Mbugua, S.K., Shin, H.K., Holzapfel, W.H. (2008): Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *Int J Food Microbiol*, 126: 57-64.
- McGuckin, M.A., Lindén, S.K., Sutton, P., Florin, T.H. (2011): Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol*, 9: 265-278.
- McKay, L.L., Baldwin, K.A. (1990): Application for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 87: 3-14.
- Michetti, P., Dorta, G., Wiesel, P.H., Brassart, D., Verdu, E., Herranz, M., Felley, C., Porta, N., Rouvet, M., Blum, A.L., Corthesy-Theulaz, I. (1999): Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (*johnsonii*) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion*, 60: 203-209.
- Midolo, P.D., Lambert, J.R., Hull, R., Luo, F., Grayson, M.L. (1995): In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J Appl Bacteriol*, 79: 475-479.
- Mitsuoka, T. (1992): Intestinal flora and ageing. *Nutr Rev*, 50: 438-46.
- Moon, C., Kim, S.H., Park, K.S., Choi, B.K., Lee, H.S., Park, J.B., Choi, G.S., Kwan, J.H., Joh, J.W., Kim, S.J. (2009): Use of epigenetic modification to induce FOXP3 expression in naïve T cells. *Transplant Proc*. 41: 1848-1854.
- Morelli, L. (2000): In vitro selection of probiotic lactobacilli: A critical appraisal. *Curr Issues Intestinal Microbiol*, 1: 59-67.

- Morona, R., van den Bosch, L., Manning, P.A. (1995): Molecular, genetic, and topological characterization of O-antigen chain length regulation in *Shigella flexneri*. *J Bacteriol*, 177: 1059-1068.
- Morona, J.K., Morona, R., Paton, J.C. (1997): Molecular and genetic characterization of the capsule biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* type 19B. *J Bacteriol*, 179: 4953-4958.
- Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hébert, E.M., Van der Meulen, R., Foulquié Moreno, M.R., Font de Valdez, G., De Vuyst, L. (2006): Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers *Appl Environ Microbiol*, 72: 4431-4435.
- Mozzi, F., Gerbino, E., Font de Valdez, G., Torino, M.I. (2009): Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in an *in vitro* gastric system. *J Appl Microbiol*, 107: 56-64.
- Navarre, W.W., Schneewind, O. (1999): Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63: 174-229.
- Neuhaus, F. C., Baddiley, J. (2003): A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67:686-723.
- Nikolic, M., Terzic-Vidojevic, A., Jovcic, B., Begovic, J., Golic, N., Topisirovic, L. (2008) Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *Int J Food Microbiol*, 122:162-170.
- Nikolić, M., Tolinački, M., Fira, D., Golić, N., Topisirović, L. (2009): Variation in specificity of the PrtP extracellular proteinases in *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. *Folia Microbiol*, 54: 188-194.
- Nikolic, M., Jovcic, B., Kojic, M., Topisirovic, L. (2010): Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. *Eur Food Res Technol*, 231: 925-931.
- Oatley, J.T., Rarick, M.D., Ji, G.E., Linz, J.E. (2000): Binding of aflatoxin B1 to bifidobacteria in vitro. *J Food Prot*, 63: 1133-1136.
- Ocaña, V., Nader-Macias, M.E. (2002): Vaginal lactobacilli: self- and co-aggregation ability. *Br J Biomed Sci*, 59: 183-190.
- O'Hara, A.M., O'Regan, P., Fanning, A., O'Mahony, C., Macsharry, J., Lyons, A., Bienenstock, J., O'Mahony, L., Shanahan, F. (2006): Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology*, 118: 202-215.
- O'Mahony, L., O'Callaghan, L., McCarthy, J., Shilling, D., Scully, P., Sibartie, S., Kavanagh, E. Kirwan, W.O., Redmond, H.P., Collins, J.K., Shanahan, F. (2006): Differential cytokine response from dendritic cells to commensal and pathogenic bacteria in different lymphoid compartments in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290: 839-845.

- Oxman, T., Shapira, M., Klein, R., Avazov, N., Rabinowitz, B. (2001): Oral administration of *Lactobacillus induces* cardioprotection. *J Altern Complement Med*, 7: 345-354.
- Palumbo, E., Deghorain, M., Coconcelli, P. S., Kleerebezem, M. Geyer, A., Hartung, T., Morath, S. Hols, P. (2006): D-Alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus plantarum* results in a major modification of lipoteichoic acid composition and cell wall perforations at the septum mediated by the Acm2 autolysin. *J Bacteriol*, 188: 3709-3715.
- Péant, B., LaPointe, G., Gilbert, C., Atlan, D., Ward, P., Roy, D. (2005): Comparative analysis of the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters from four strains of *Lactobacillus rhamnosus*. *Microbiology*, 151: 1839-1851.
- Pelletier, C., Bouley, C., Cayela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P., Bellon-Fontaine, M.N. (1997): Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl Environ Microbiol*, 63: 1725-1731.
- Perea Vélez, M., Verhoeven, T. L. A., Draing, C., Von Aulock, S., Pfitzenmaier, M., Geyer, A., Lambrechts, I., Grangette, C., Pot, B., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C. J. (2007): Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol*, 73:3595-3604.
- Peruchoa, M., Goldfarba, M., Shimizua, K., Lamaa, C., Fogh, J., Wiglera, M. (1981): Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. *Cell*, 27: 467-476.
- Portier, A., Boyaka, N.P., Bougoudogo, F., Dubarry, M., Huneau, J.F., Tome, D., Dodin, A., Coste, M. (1993): Fermented milks and increased antibody responses against cholera in mice. *Int J Immunother*, 9: 217-224.
- Ramos, A., Boels, I.C., de Vos, W.M., Santos, H. (2001): Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 67: 33-41.
- Ranadheera, R.D.C.S., Baines, S.K., Adams, M.C. (2010): Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res Int*, 43: 1-7.
- Reid, G., Mc Groarty, J.A., Domingue, P.A.G., Chow, A.W., Bruce, A.W., Eisen, A., Costerton, J.W. (1990): Coaggregation of urogenital bacteria *in vitro* and *in vivo*. *Curr Microbiol*, 20: 47-52.
- Reid, G., Bruce, A.W., Taylor, M. (1995): Instillation of *Lactobacillus* and stimulation of indigenous organisms to prevent recurrence of urinary tract infections. *Microecol Ther*, 23: 32-45.
- Reid, G., Beuerman, D., Heinemann, C., Bruce, A.W. (2001): Effect of oral probiotic *Lactobacillus* therapy on the vaginal flora and susceptibility to urogenital infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 32: 37-41.
- Reid, G., Bruce, A.W. (2001): Selection of *Lactobacillus strains* for urogenital probiotic applications. *J Infect Dis*, 183: 77-80.

- Robbins, J.R., Barth, A.I., Marquis, H., de Hostos, E.L., Nelson, W.J., Theriot, J.A. (1999): *Listeria monocytogenes* exploits normal host cell processes to spread from cell to cell". J Cell Biol, 146: 1333-1350.
- Rook, G.A.W., Brunet, L.R. (2005): Microbes, immunoregulation, and the gut. Gut, 54: 317-320.
- Roos, S., Lindgren, S. Jonsson, H. (1999): Autoaggregation of *Lactobacillus reuteri* is mediated by a putative DEAD-box helicase. Mol Microbiol, 32, 427-436.
- Roos, S. Jonsson, H. (2002): A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. Microbiology, 148: 433-442.
- Round, J.L., Mazmanian, S.K. (2009): The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nat Rev Immunol, 9: 313-323.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P. (2002): An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Int Dairy J, 12: 163-171.
- Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilán, C.G. (2005): Invited review: Methods for the screening, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. J Dairy Sci, 88: 843-856.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C.G., Salminen, S. (2006): Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. J Food Prot, 69: 2011-2015.
- Ruas-Madiedo, P., Abraham, A., Mozzi, F. de los Reyes-Gavilán, C.G. (2008): Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In: Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications ed. Mayo, B., López, P. and Pérez-Martínez, G. pp.137-166. Kerala: Research Signpost.
- Ruas-Madiedo, P., Medrano, M., Salazar, N., de los Reyes-Gavilán, C.G., Pérez, P., Abraham, A.G. (2010): Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate *in vitro* de cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells. J Appl Microbiol, 109: 2079-2086.
- Saavedra, J.M., Bauman, N.A., Oung, I., Perman, J.A., Yolken, R.H. (1994): Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. Lancet, 344: 1046-1049.
- Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Kolida, S., Collins, M., Rastall, R., Gibson, G. de los Reyes-Gavilán, C.G. (2009): Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human faecal microbiota in pH-controlled batch cultures. Int J Food Microbiol, 135: 260-267.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Mattila-Sandholm, T. (1998): Demonstration of safety of probiotics -A review. Int J Food Microbiol, 44: 93-106.

- Salminen, M.K., Järvinen, A., Saxelin, M., Tynkkynen, S., Rautelin, H., Valtonen, V. (2001): Increasing consumption of *Lactobacillus* GG as a probiotic and the incidence of lactobacilli bacteraemia in Finland. *Clin Microbiol Infect*, 7: (Suppl 1) 802.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sánchez, J.I., Martínez, B., Guillén, R., Jiménez-Díaz, R., Rodríguez, A. (2006): Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Appl Environ Microbiol*, 72: 7495-7502.
- Sánchez, B., Bressollier, P., Urdaci, M.C. (2008): Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 54: 1-17.
- Sánchez, B., Fernández-García, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C.G., Ruas-Madiedo, P. (2010): Technological and probiotic selection criteria of a bile-adapted *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain. *Int Dairy J*, 20: 800-805.
- Schachtsiek, M., Hammes, W.P., Hertel, C. (2004): Characterization of *Lactobacillus cornyformis* DSM 20001^T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Appl Environ Microbiol*, 70: 7078-7085.
- Servin, A.L. (2004): Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev*, 28: 405-440.
- Shanahan, F. (2000): Probiotics and inflammatory bowel disease: Is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis*, 6: 107-115.
- Shornikova, A.V., Isolauri, E., Burkanova, L., Lukovnikova, S., Vesikari, T. (1997): A trial in the Karelian Republic of oral rehydration and *Lactobacillus* GG for treatment of acute diarrhea. *Acta Paediatr*, 86: 460-465.
- Siezen, R.J., Francke, C., Renckens, B., Boekhorst, J., Wels, M., Kleerebezem, M., van Hijum, S.A. (2012): Complete resequencing and reannotation of the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 genome. *J Bacteriol*, 194: 195-196.
- Sillanpää, J., Martínez, B., Antikainen, J., Toba, T., Kalkkinen, N., Tankka, S., Lounatmaa, K., Keränen, J., Höök, M., Westerlund-Wikström, B., Pouwels, P.H., Korhonen, T.K. (2000): Characterization of the collagen-binding S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. *J Bacteriol*, 182: 6440-6450.
- Steen, A., Buist, G., Leenhouts, K.J., El Khattabi, M., Grijpstra, F., Zomer, A.L., Venema, G., Kuipers, O.P., Kok, J. (2003): Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *J Biol Chem*, 278: 23874-23881.
- Stiles, M.E. (1996): Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, 70: 331-345.
- Stingle, F., Neeser, J.R., Mollet, B. (1996): Identification and characterization of the *eps* (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sf6. *J Bacteriol*, 178: 1680-1690.

- Stingele, F., Newell, J.W., Neeser, J.R. (1999): Unraveling the function of glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J Bacteriol*, 181: 6354-6360.
- Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Sutcliffe, I.C., Harrington, D.J. (2002): Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiology*, 148: 2065–2077.
- Sutherland, I.W. (1972): Bacterial exopolysaccharides. *Adv Microb Physiol.*, 8: 143-212.
- Swardfager, W., Lanctôt, K., Rothenburg, L., Wong, A., Cappell, J., Herrmann, N. (2010): A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, 68: 930-941.
- Szajewska, H., Kotowska, M., Mrukowicz, J.Z., Armanska, M., Mikolajczyk, W. (2001): Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J Pediatr*, 138: 361-365.
- Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M.C. (2003): Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Res Microbiol*, 154: 705-712.
- Tannock, G.W. (1999): Analysis of the intestinal microflora: A renaissance. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 265-278.
- Terzic-Vidojevic, A., Vukasinovic, M., Veljovic, K., Ostojic, M., Topisirovic, L. (2007): Characterization of microflora in homemade semi-hard white Zlatar cheese. *Int J Food Microbiol.*, 114: 36-42.
- Toba, T., Virkola, R., Westerlund, B., Bjorkman, Y., Sillanpaa, J., Vartio, T., Kalkkinen, N., Korhonen, T.K. (1995): A Collagen-Binding S-Layer Protein in *Lactobacillus crispatus*. *Appl Environ Microbiol*, 61: 2467-2471.
- Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I., Lozo, J. (2006): Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int J Food Microbiol.* 112: 230-235.
- Torino, M.I., Hébert, E.M., Mozzi, F., Font de Valdez, G. (2005): Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in an adenine-supplemented chemically defined medium. *J Appl Microbiol*, 99: 1123-1129.
- Tsukioka, Y., Yamashita, Y., Nakano, Y., Oho, T., Koga, T. (1997): Identification of a fourth gene involved in dTDP-rhamnose synthesis in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 179: 4411-4414.
- Vaishnavi C. (2010): Clinical spectrum & pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases. *Indian J Med Res*, 131: 487-499.
- Valeur, N., Engel, P., Carbajal, N., Connolly, E., Ladefoged, K. (2004): Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 70: 1176-1181.
- van Geel-Schutten, G.H., Faber, E.J., Smit, E., Bonting, K., Smith, M.R., Ten Brink, B., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F., Dijkhuizen, L. (1999): Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the

- Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Appl Environ Microbiol*, 65: 3008-3014.
- van Hemert, S., Meijerink, M., Molenaar, D., Bron, P.A., de Vos, P., Kleerebezen, M., Wells, J.M. Marco, M.L. (2010): Identification of *Lactobacillus plantarum* genes modulating the cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Microbiol*, 10: 293.(1-13p)
- van Hijum, S.A.F.T., Kralj, S., Ozimek, L.K., Dijkhuizen, L., van Geel-Schutten, I.G.H. (2006): Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70: 157-76.
- van Kranenburg, R., Vos, H.R., van Swam, I.I., Kleerebezem, M, de Vos W.M. (1999): Functional analysis of glycosyltransferase genes from *Lactococcus lactis* and other gram-positive cocci: complementation, expression, and diversity. *J Bacteriol*, 181: 6347-6353.
- van Pijkeren, J. P., Canchaya, C., Ryan, K. A., Li, Y., Claesson, M. J., Sheil, B., Steidler, L., O'Mahony, L., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D., O'Toole, P. W. (2006): Comparative and functional analysis of sortase-dependent proteins in the predicted secretome of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl Environ Microbiol*, 72: 4143-4153.
- van Tassell, M.L., Miller, M.J. (2011): *Lactobacillus* Adhesion to Mucus. *Nutrients*, 3: 613-636.
- Vescovo, M., Scolari, G.L., Botazzi, V. (1989): Plasmid encoded ropiness production in *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. *Biotechnol Lett*, 11: 709-712.
- Vesterlund, S., Palta, J., Karp, M., Ouwehand, A. (2005): Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. *Res Microbiol*, 156: 238-244.
- Vidgren, G., Palva, I., Pakkanen, R., Lounatmaa, K. Palva, A. (1992): S-layer protein gene of *Lactobacillus brevis*: cloning by polymerase chain reaction and determination of the nucleotide sequence. *J Bacteriol*, 174: 7419-7427.
- Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. (2003): Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Res Int*, 36: 895-904.
- Vizoso Pinto, M.G., Rodriguez Gómez, M., Seifert, S., Watzl, B., Holzapfel, W.H., Franz, C.M. (2009): Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro. *Int J Food Microbiol*, 133: 86-93.
- Volta, S., Castagliuolo, I., Elli, M., Longo, S., Brun, P., D'Inca, R., Porzionato, A., Macchi, V., Palù, G., Sturniolo, G.C., Morelli, L., Martines, D. (2007): Aggregating phenotype in *Lactobacillus crispatus* determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa. *Clin Vaccine Immunol*, 14: 1138-1148.
- Walling, E., Gindreau, E., Lonvaud-Funel, A. (2005): A putative glucan synthase gene dps detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider. *Int J Food Microbiol*, 98: 53-62.

- Walter, J., Loach, D.M., Alqumber, M., Rockel, C., Hermann, C., Pfitzenmaier, M., Tannock, G.W. (2007): D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Environ Microbiol*, 9: 1750-1760.
- Walter, J., Schwab, C., Loach, D. M., Gänzle, M. G. Tannock, G. W. (2008): Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology*, 154: 72-80.
- Wolff, B., Burns, A.R., Middleton, J., Rot, A. (1998): Endothelial cell "memory" of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies. *J Exp Med*, 188: 1757-1762.
- Yang, X.O., Nurieva, R., Martinez, G.J., Kang, H.S., Chung, Y., Pappu, B.P., Shah, B., Chang, S.H., Schluns, K.S., Watowich, S.S., Feng, X.H., Jetten, A.M., Dong, C. (2008): Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*, 29: 44-56.
- Yasuda, E., Serata, M. Sako, T. (2008): Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain Shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides. *Appl Environ Microbiol*, 74: 4746-4755.

PRILOG A.

DNK sekvenca dela pCG1 plazmida od 26,463 kb gde je lociran operon za EPS-CG11 (od 6746 b do 21801 b). Početak sekvence je sa restrikcionim *Bam*HI mestom.

GGATCCTCCAGACTTGAACCTTATTAGTTCATAGTCATTGTAATGCAACGA
GCATAGCAATTCAACGTAAATATAAAGATACAAATCACAAGTATCAAAT
ACATGAAACTTGTTACAAATTACTTTTTGTTATTTTTGCGATTTTTGTTTA
TAAACAAGCTGAATAGTGGTATGGTTAATTCATAAAATAGAACATAAAAA
AACACCCACCGACGGGAATCGGTGAGCGCCACATAAAAGTCATCATTGTT
TAATGACTATTATATCATGGCCGGTGCGATTTTTAAAGCCCTAGGGGACA
AGCTGGGGTCTAAATCCAAGGGGACACGTTTGCCAGTGC GACTTCAATAA
GTCTGGCTATAACCACAACAAGGTCATCTGTACGGCTGGGTGGTGAATGGT
GAGCGCGACCATTAACGGCGCGGGTGGTAAAACGAAGCTTCGGCTTGGTG
CCACTGATTAGTTGGTGATCGAACAAACATAAAATACGTATTGCCAACGCC
TACTAGGGCGTTTTTTTAGTAGGTTAAACCGAAAACGTAGGTTTATAATGA
GTGGTGGTAGCAATACCGCAATTGTACAGACAAGCGACGGGCGTTAACGA
CCGACGAACTAGGGGAAACCTTAGCGTAGAATTGCACTCTGGTTCAGTT
ATTCCAAATAGCTGTTTCCAGGGAACAATTCTGCGCTCAAAACGTCCTC
CCTCTAAACTGAATGGAAAACCATAACCCGTCAAGTCAAATTCCAAAGAA
AAAAAGAAAGTTGGTGAATTGTTGGAATGTAAGGATTACATTGTTCCAT
TTGAATCCAGATGTGATCGTTAAGAAGACAATCTATCGGAGTTCTGCAAG
AATTACTGATCGACAAAGGAACCAAGTGAAGAGAGTTTTGCGTAGTCAAG
GGTATCAGGGAAGAATTAGTAGTATTCGATACACTCGAGTAAATTACAAG
TATTCATTTAAAGTATCAGTGAAGTATCGGGGAAGTGTGGCAAATTTTT
GGTTAATACAAAGAATGAGACAGTTGAATTTAAGGGAATGGTCTAGGAGT
AATACCAGTAAATTTACAAACTTCCTTTTCTCAATTAAAGCCAATCTGC
GACCTATAACCACTTCCTTTTTGGACAAGCTCACAAATCAAAAAAGAACGGA
ATGTTGTTCCCTCGGTAATGAATCAGGTTACTTGGGATAAGCCGCTTAT
GTGAAGTAGAAATTGGTATACTAAAAAGGCTCCCGGTTTAACTGGAG
GCCTTTTTTCTAGGTTACATATTTTGAGGATGAATGTTCTTATCTTCGTA
GCTTTTACTTGGGTGCCGTACCCCGCAACAGATGTGTCGCTTCGTTGGTA
TTATCTTAAATGCTAAGTACCGAGTTGAGAAGGATCATAAAGATATTGGC
GTCATAATCCCACTGGACGACGAAGAACTTAAATTTTTAATGACTAAAGC

CTTGAGACGTTACTTTAGAACGTGTTTAGAATCTTTTCAAGAGTATTCGC
AGGAAGGCTAAGCTAATCATCATCTTACTGGTGTTCAGCTTTCGCTCACA
ATTGCGCCAGAGGGCCGATATTTTCTAGCCAGCTAAAACTGCGTTCGA
TAACCCAGCGTTGCGGGGTCACCTTGACCGTGCCTAAGGTCACCTCTGTTTA
GCAATAATGACTTCAGCGTTAATCATTGCTGAACTGATTGAGCAAAGTT
GTTACCAGTATAACCACCATCGGCCATTACTCGTTGAACCAGGTCAAACCT
GTGATTTGTTTAAACGCCAGTAGCGCATTGGCGCCATCACGCTCAGAAACA
TTGGCGGTTGTACATGGACTGCCATCGGCAGCCCATTTGATATCTACAGC
AAGATGGCGCTTAATCCCCTCACCTTTTTTACCACCATCGTAGCCACTAC
TTTCAGCAGGATCGGTATTCTTGATACTTTGAGCATCTAGAATGATGAAC
GATGTATAAACTGAACGCTTCTGAGCCAACCGATGTTGGCTGACAATTTT
TTTAAAACCTTATCCAGAGGAGTGATAACCAGCAGGAGATGGCGTTTTAGT
CCAAAGTAACCAGTAATAATAGACGGTTTTCCCATTTAGGAAAATCACTGG
GTAAATCGCGCCAAACGCACCCATTTTTCAAGGTATAAAGCAGGGCACAA
AAGATATCATATAAAATCAACCTTTCTTGGCTTAGTCCGCTTACGTATGCC
TTCTAGATCTGTCCGATTAGTTCAAATTTGTTACGAGAGATGTCGCTAC
TATAATGGTGTGCAAAGCTTTTCATGGATTAAAACTCCTGTTTTTGATC
TAATTTAACTAAAATCAAATCGAATGTCAAAGTATCCAAAACAGTTCTTA
ACGCCCTAAGATGCAATGAGAAGCACATCAAGAACGTGGAAAACCTACCTG
TACGGTACCATGCAAAATCTATTTGGTGTTTGGTGGAAATAACAAGCGGC
TAGAGAATATGCGGCCAAACACCCCGAAGAAGAAAAGTCGGCCGACAACG
ATAACAGTGGGTTGTACTACTAGTCCATAAAAGGCTACAAAATCCTTTCTA
AACAGTTTTAAGACTTACTAACCTCTTTATACTTAAGTTAGATTTAAATG
GCTTAAACAGAATAATAGGGGCTTTTAAATGAGCGCCAGAGCTAACCAGC
TCAAAGTTTTAGCCTTTAGATCAACGCCAAGCTCAAGTGGTCTGAGGCCA
GGTTTTTATCCGTTGATCAGATACTCAAAGGTAGTATAATGGTAGTAGC
AAAAGGAAGGGGATGAGACAATCATGGCAGTTAAGGAAAAGAAAACGGGTC
CAAGTCAAGATTGATAAAGATTTGGCCGATGATACCGAAGCAGTTTTAAG
CGAATTGGGCTTAAATCCAACCACGGCCATTAACATGTTTTACAAGCGGA
TTGTTGCTAATGGTGTCTTTACCTTTTAAATGTGTCTTTAAGCGAAGAAGAA
AGAGCTAATTTACGCTTTTTTAAAGGCGACCGAAGGGACACCAGTCACCGA
GTTCAAAGACGCTAAAGAGGTGCTGATTGGCTCACGATCCAGATGAGGA
CTAATGACTTAGTCAGCCTATACGTTAGTTTTGTAGAACTAACGGTGGC

AAGTCTCGACCAGTTTTAATTCGTCTGGGTATCAGAACAGACGGTCGAGGC
TTTTAAAATTACTAGTCAGTATGAAAAGAAGTCGGCTTATATCAAGCAAC
AATATTATCCGATTCAAGATTGGCAATCCGCTGGGTGAAGAAACCTTCC
TGGGTCGATCTTGGTAATATTTATCGCTTTCCCAAAGCCGGTTTAAACTT
TAAAGAAATCGGTCATTTAAGTAAGCTAGATCAAAAAGAAGAGGTAAGGG
TCAAAAGATAATTCACAGCGATCAAGTAAAAGGAAGCACAAAGAAAGTA
AAGCAGAGCTTACACAAAGAATTCAAAAACAGTTAAAAGACTTTGCTAAA
CACAATCCTGAAAATAAAAACGATCGGCCTAGTTATATAGGTTGATCGTT
TTTTAATTTATCCGGTTTATGGGCGTTAACATAGTCAGCAAATGTTTTTA
AAAGTTCTTCGGTTTGTTCGACCGAGAGGTTATTAGCTTGAAAGTACTTT
TCTAATAAAGCCCCTTTTTTAATTAATCGGCGAGAACGGGCTTTGCGGGC
TTGCCGATTTTCATAGTATTTAGATTGCCGTAATTTAAAATCTTCCCGCT
CAATTTTTTGTTTTAAACCGCTTGCTGCTCGACTAGTTTTTCATATTGA
TTAGACATGGAATTTCCCATCTCGTATGGCTAATGATCTACGGACTTTA
CCTTTAAAATTCAGAAAATTGCTTTGGCTAAAAGCTTAATCTGATCGTT
AGACAAATTAGCATAATCTAAATTGGATTGACTGATGATTTGTTTACCTA
TCCGTTGTTCAATCTTATTTTTTTTCAGCTTTAATCTTTTGATTAAGCTGT
TTTAATTTAGCTTCTTGTTTTTCTAAGTTGCTTTTAGACATAACGATCCC
TCCAATCATATTA AAAATAATCACCGACACTATATCATACAGAGAATGTT
AATTCAAAGGATAAAAAGTTGAAATAGCGAAGCGGAAGGCATACACTAAAA
GTAAATTCAGGAGAATCAGCAGACTGAGTGAAACTAGGTCAATGCGCACT
TACACATAGAATAAATTCTATGTTGTGATAACCCCCAAAATCCTGTATTA
GAAGTCGCCGATGGCGACAACAAAGTCAATCCCATAGAATCAAAGTAAAG
AGGTGACTAACATGACAATATTTTCATATGAATTTTAGTAATATTAGTGCT
GGTAAAGGACGCAGTACCATTGCCAGTGCCGCTTATAGAAGTGGTGAAAA
ATTATTTGATAATCAAGAAGGCCGCCACTATTTTTATGGCCGCTCGGTTA
TGCCAGAAAGCTTTATTTTAACCCCAAAAAACGCACCAGAATGGGCCAGT
AATCGAGAACAATTATGGAATGAAGTTGAAAAGAAAGATCGTAAATCAA
CTCACGGTATGCCAAAGAATTTAACGTGGCTTTACCGGTAGAATTAAGTG
AATCCGAACAGAAAGAATTACTGGCAAAATATGTGCAAGAAAATTTTGTC
GATCAAGGTATGGTAGCTGACGTAGCAATTCATCGCGATCACCCAGACAA
TCCGCATGCACATGTGATGTTAACCAATCGCCATTTAACCCCGGTGGTA
GTTGGGGATTAAAAGCAAAGACGCAGTACATTAAGATGAAAATGGCAAG

CAACTTTTAACCAAAAAGCGGGTTTCCAAAACAAAGAAAAATTTGGTTGGT
TGATTGGGATAAAAAAGGAAAAAATTAATGAGTGGCGGCATAATTGGGCA
ACAAGTGTTAATCAGTCTTTAGCACAAAAAATATTCGGATCGGATTAG
TGAAAAATCGTTTGTTCGATCAAGGGATTCAAGAGACACCTACCCAACACG
AAGGCATTAACAGCCAAAGAAAAAATCGAAAAGCATTTAATCAACAAGTT
AGAGCGCAAAGAAACGCTCAAGCTAAATATCATAATCTTGACGAAAAGAT
AAGAAATCATGAACATTTTGACGCGTCAACTGACGAGCTATCGTTCTCTG
AAAAACACACAATTAGTTATCTAAGTCAGCAATTGAAAGCCTATGTCGAT
TTAGAACATTTAGATGATAAACAGCGCATGCTATTTAATTGGAAAAACAG
CTTATTAATTAACATGCTGTTGGTGAAGATGTAACCAACAACACTACTGA
CCATTGACCAGCAAACGACATCACTAGAACAAGCTAATCAGTTGTTAAAT
AAAGTGGTGGAACGAGCAACGAAAAAGCTTTATCCGGAACCTAATTTTGA
ACAGACAACCGCGGCTGAACGACGGGAACTGATTAAAGAACTAATAATG
AACAAACGATTTTCAAAGGTGGCGAATTGGCAGAACGGTTAGCGGATATT
CGAAACGACTTATTAACCTCAGCAATTATTGACGTTTACCAGGCGGCCATA
TACCAGCTGGCAGTTAGTTAATCAGCAAACCCAGACGATTGAGAAGCAAT
TAACCACGGTACTAGCCAAACATGGTCACCAGTTAGACGATTTGAAGCCT
ACTGATCGGGGCATGCTAGCCGTTTATGAACCTAACGAACTCGAATTCAT
TTCTAAAGCGGTCAAAGATTTACGGGTCATGCGGGAAGTTAAAGCCGTGG
TGCAAACCCAATACGACAGCATTCTAACGACTGCTTTTCCGGACAGTGAC
CTGGATAAGCTAGAGACGATTGACAAGGAGCAAATTTATACGGCTGTGGT
TTACTATGATCCAGAATTAAGCCATTAGATGCAAACCAGCTTAGTCAAT
TACAACAGCAGCCACCGGTGCTCTTTACTAGTCAGCAACACCAAGCCGGT
TTGAATTACCTGTTAGGTAAAATGGAATTAAGATATTCAGGAGCATCG
ACTGCAACGGGTCTTAAAACATGATGGCACCCGGCAACTGTTTATCGGCG
AATGTGGCCAAGATCCTAAGTTGGATCACAAATAAATTGAAATGGTGCAA
ACCCGTTTGAACAACAGACAACGCGGTTTGATCAATATAAGCAGGCTCA
AGTTAAAGACTATCGGGCCATTAATTACCACCCAACCTAGCCCCAAAAATT
ACCTGATGAATATTTTGGACTTATGGCTGTTTAAAGTAGCGGGTAAGCTG
GTGACCAGCGGCCGGCAACTTTATCTAAAATTAAGCCGCCACCACGTCTA
TCAGGATTTGTTTTATCAACTGTTAGCTCGAATCCAAGCGCTACAGTGGG
GCTAAACTGGTGCAATAAATCAAAAAAAGTCGGTTCGGCCAAGGGGCAAG
TATGCTCAAAATTGAGGATCAAAAAATTTATCCAGCCCCATAATTTGGTAG

CCTCCTAGCAAAAACGGTACATCTTGGTTTACTACGCCATAGCAGCAGC
AGAATTGGTCCAAAATTGTGCGGTATGCCGATATTAAACCTCGTATGAAT
AATTCGGGTGACACAATTGTAATTAATGCTCGTTTTGTTATACGATTGTC
ATGAAACTGTTATGTAAAGTTGTTATAATGGCAATGAATTGAACCATAAG
TAGTCGTGTTAAATTAAGGATGGTCAGGTTATGTCTGCTAATTATAAAAT
TTAAGTGCCTAAATCAGTCGGTAGTTTTAGTAAAAGAAGCTTTTTAAAT
GAACGAAATGAGCCATTCAGAGGCAACCCTGAGTATTGAAGATATATGGA
TCAGTTGCTTAAAGTATTGACTGAGCAATTTGGTTTATGGCAGGTTACTG
GGCGCAATGGTGTGGTTTTGATGAGATGGTTGAATTAGATTTACAGTAC
ATAGAAAAGAGTAGCTTCTGGTTTTGATCTGAAGTTTATGTTTATGACTGT
TAAGATTATGGTTATGCCGAATAGCGGTATTAGGTTGGGTGAATTAAAT
GAATATTGTATATGGATGTGACGATAAAATTTGCGCCAGTTTTATATGTTT
CAATCGCTACCTTAATTAATTAATCAATAAAGATAGTAAGTTGAATATATAT
ATAATTGATGATCATGTATCTAAGACTAGTAAGGATGCTATTAATAAAT
AAAAAAGAGCAACAACAGATTTTTTGGTTACCGATGCTGAATATTAATA
ATGAGGTTGGTAGTGCTATTTTCAATTTGATAGAGGTTTCTGCGCAATTT
GCGCGTATATTTATAGCTAGATACTTACCGAATAACGTTGACAAAAGTTCT
TTACCTAGATTGTGATACGATGATTACAGCATCAATAGAAGAATTATGGA
ATTCAGACTTAAGTAATATAACTTTTTGGTGCTTGTTTAGACGCATTTGGG
GAACTTTATAGCCAAAATTTAAAATTACCTCTTAATGCTAATTTAATAAA
TTCAGGAGTACTTTAATAAATTTAGTTAGATGGCGATTTAATTATAAGG
AAAGTCAGGCCATTAAAATTTTAAAGGAGAATAATGGGAAACTTCAGCAA
GCTGATCAAGGATTATTAGATATTTTAGTACAAAATGATCTCAAGATACT
AGATCCTAAATTTAATTGTATAAATGGATATTTTGAGTTTTCTTATAGTG
AATGGATCAAATATAGGAAACCCAAAAAAGCTTATACCGATATATATACT
GCTCATTTAATAACAAAATGCTGTGACTAATCCTGTTATTGTACATTTTAC
AAGTTCTTTTTTAAATGATAGGCCCTGGATTTTGGGAGCTAAGCACCCCT
ATAAAGAAAGTTGGTTTAGGGAGCTTAATAAAAGCACTTTAACAATGAAA
ATGCTAGATCAAACGAGTTTTCTGAAGATTATATTTGAAAAGTTACCGCG
GCATATAGCAATAAATATTTTTGGAATCTTACAGGCATATCTAAGACCGA
TCTTTAAAAGAACGTAAGCTATACTATGGTTAATCTAATGTAAAAGGATG
GAATAATGAACTATTTAGAGAAGTTACGAGCAACAATGACTGATGAAAAA
AAAGAAAGTGCTAAGAAGGATATCTTTGCATTTTATATAGGGCGTCCCCT

TTCATATATACTTACTGTTCCATTTTTGTGGTTAAACGTAACCTCCTAACT
TTATCTCAGTTATTGCATTTATTGAGATTATATTGGCTGGAACGATTTTA
GCAGTAGCCAATACTCTACCTGTAGCATTGATTGGGTGGTTTCTCTTCTT
CTTATGGAACCTATTAGATGGGGTAGATGGCAATATTGCAAGCCTTAAAA
AAAATGGCTCACCCATAGGGTCTGTGTATGATGCGATGAGTGGATACGCA
GCAATGTTTTTGTGTATTTTAGTGCAGGTATTTGGGCGTCTAAAGTTAG
TGTAATGGGATCATTACTTATTATTATTGGCTCAATATCTGGAATGTCTG
TTTTATTCCCGAGATTGGTAATGCATAAAGCTGCCACTGCAGTTCAAAA
AATAATTTGAATAGCGAGTTAGCCGATAGAAGTGATTTTGGCATTGTTAA
ATCGATAGTTCTAAATTTCACTAGTATTTCTGGATTAGTTC AACCTATTT
TATTGATAGCAATAGTAACTAATAAAGTGGTAATGTTTACTGTTGTTTAT
CTTATAATTAATGTAACAGTTATGCTAGGATCACTATACAAAAATATTAAA
ATAAAAATTTAGTAGCTTTTTTGCATTGTTTTGGAACAGAAGGTCCTTAAA
TTTATATTAGTAATAAGCTATGATAAGAAATACAAAGTCAATAAAAAATGT
CAATGAGGTAGCAATGAGAACAATACATGTATATTTAACTGGAAGATTAG
GAAATCAGCTTTTTCAATATGCTTTTTGCCAGAAAAC TACAAAAACAATAT
GGTGGGAAAATTATTTGTAATGTTTATGACTTAGAACATAATAATAATAA
AATAAAAAATAATAAAGGTAAATCGGAAAAATTTCAATACGATATGTCTA
ACTATATTTTGAACGATAATGTTGAAATAGAAGATAGAAAGCTCCCGTGG
TATGCCGATTTTAATAATTTTTTGGTAAAAGTTATTAAAAAAATTTTTCC
GCGCCTATACTTTGAACTTATGGCTAAATTTGGCTATTTAATTTGGCAA
GAGATGATTATATAAATATACCTAAAAATATGTACAAGTCAGATAACTATT
TGTGGATGGTGGCAAGATTTCCGATTTTTTAATGGTGTAATGAACAATT
GTCTAATGAAATAGTTCCCAAGACTTTACCAGTTCAAAAAAATAAAGAAA
TGTATGAGTTAGCAAAGAACAAGGAATCGGTTTGTATATCAATACGTGGA
GGTAATTATCTTGTTCCAAAGATAAAAAGAGTTACTTTTTGTTTGTGATAG
AGATTATTTTTTATACCGCTATTGAGCAAATGAATCTGGCATTAAATAAAC
CGGAGTATCTCATTTTTTCTGATGACTTAGACTGGGTTAGATCATATTTA
CGTTTGAAGAGAAGTTTCCTAATTATAAAATTTCACTACGAAAAGCGGTGA
AGATTCAGTTGAGGAAAAATAAGAATGATGACCGCGTGAATAATTTTA
TTATATCAAACAGTTCCTTTAGTTGGTGGGCACAATATCTTTCAAAAAAT
AAAAATAAGATTGTTATGGCTCCAAATCTTGGTTTGCAGATGGTCGACA
AAATGGGTTATATATGAAGGATTGGATTTTTATTACCAGGACGTACACGGC

GGTAATTAGTAGAGAAGATGATTTAAGAAAGGGATACTTTCTAATGGCAG
AGGAGCTTATTTCAATTATTATGCCGGTTTACAATGTAAGTAAATATGTT
GAACATAGTATTAAAAGTTTAAATGAATCAAACATACCATAATTTAGAAAT
TTTAGTAGTAGATGATGGATCAACGGATAACTCGTATGAAATATGTAAAA
GTTTAGAAAAAGAAGATTCTAGAATAGATGTATTTTGAAAAAAAAAATGGT
GGGCAAGGATCTGCAAGAAATATGGCTTTAGATAAAGCCCATGGTCAATA
TATTTGCTTTCTTGATTCTGATGATTTTGTAGAAGTAGATTATATTGAAT
ATTTATATACATTACTAAAGTTAAATGATTTAGACATTTCTGTGTGTAAAC
TATAAACTGTATGATGAAATGAAAAATTGATACGCACGCGTACTGTAGG
TGAAGGTTATATTGAGCTGAATGGTATTGCTGCAATAAAAAGTATGTGGA
CTCAAGGTGTTGTTAATATAGGCCCTTGGTGTAAATTATATAGGAGTTAC
CTTTGGGAAGGCATCAAGTTTGAGGAGTGCTTTGGTGAAGATCTTGCCAC
TATGCATTTAATTTATGAGCGCGCCGGTAAAGTTGGATATTCATATGAAG
CTAAATTGAATTATAGAGTTAGAAATGATTCTTCAATCCGAAAAATTTCAA
GAAAATAAACTTGATTTGATTCAAATTGTTACTGATAATTTGAATTTTGC
AATAAAGTATCCTAAATTAGTACCAGCTGCAAAACAAAAAGCTGCCTCAG
TGTATTTCCATGTTTTGTTCCAGTTACCAGACGTTTTTGAATATTCATGAT
GTAAGAAAAAATAAAGAATAAAATACGAAAAATACGCTGGGATGTTTT
AACGGATAAAGAGTGTATTAGAAAAACAAGAATTGCTTTGATATTATCTT
ATTTTGGCTTTAATTTAACGCAAAAAGTTTTCAATACAGTGAGAAGAAAT
AATATTATTTTTTAACTTAATTTATACAGATTAAGGATGCGATGTTGTG
TTTAGAAATAAACTTTAACAGGAATACTGAAGGTATCTTTCAGTAATCT
TTGTATAGCTTTATCTGGGATATTTGTGGGTTTTATCATTCCTAAAATAC
TAGGTGTAACAGAATATGGGTACTATAAAAATTTTTACCCTATATTCTGTT
TATGTTGGTATCTTTTCAATGGGTATTTCAGAAGGGATGTATTTAAAATA
CAGTGGAATTTCTACACAAATTTAGATAAAAAGTAAAATTAGAGCTTTTA
CACATATAGTAGCCATCTTAGAATTTTGTGTTGCGTACTGATTGCAATA
CTTTCATTCATCTTTTTTAAAGGACAGTATCGTGTCATTTTTATTGCTTT
ATCTATATATCTTTTTAGTCTAAATATGACGACATACTATCAATATGTAG
CTCAAATGACTTTGCGCTTTTCTGATTATTCAATGAGAAATATAATTAGA
TCAATATTCAATATTATATCTACATTAATTTTGACCTTTTTTTATTATTT
CAATCAAAAAAATTCATTTTATATAAGTATTATTTATTTTTCAGTGCTTT
TTATAAGTATTATTTTACTTTTTAATGTATATAAAAAAATTTAAAGAAGTA

TCATTTGGATCTAAAAATGATTTTATGAATTATAAAGACGAATTAATTGA
GTTGATGAAGTTAGGTATTCCATTTCTAATTGCATCTGTATGTTGACTC
TAATATTAECTATTGATAGCCAGTTTATTTTTCAGTGCTTTTAAATATGCGG
ATTTATGGTATATATGCTTTTGCATATAATTTATTATCTTTAGTTACTGT
TTTCACGTCTGCAATATCAGTTGTTTTATATCCGACATTAAAAACAATTAA
AGCAATCTACACTAGTCAGTAAATATCATACTTTATCTTCATATGTTTTC
TGTTTCGTATACTTATCGCTGTTTCATATACTTTCCATTATGTATATTTAT
TAAAAAATTTCTACCTCAATATATAGAATCATTAGCATTTTTTTCGAATCG
TATTTTCTGGCTTAGCGTTTAGTTCTGTAATAAGCGTAGTTATACAAAAAT
TATTATAAAGTTATTAATAAGAACAATCTATTTTTTTATGAAAAATTTAGC
AGTGTTAGGTATTTCTTTTATTGCTAATTCTATTGCTTATTATATTTTTTA
GAACTCCAGAATCAATTTTCATTTGCATCAGTACTTACACTGATTATTTAT
TATATTTTAGCTGAAGTATATTTTGTGAAAAATTATCATATAAAATGGAG
AAAAAATTTACCTATGCTCTTTTTATGATGTTTATTTTTTACATTATTA
CAAGTGTATCGGATATCTATATAGGTGGAATTACTTATATATTTGGTTTTT
CTATGTATTTTCATTCATATTTTATCATAGATTAGTGAAGGATTTGTTTAT
TCATCTAATACACAAATAGATTTCTGAATTATCATGAAGGAAGGTGGTA
GAAAATATGTTGTATGTAATATGGGGAATTTCTGTTTCTGTTCACTATCAT
ATATGCTTTTAAATAATAAAAAATAGTAAAGTTTATCGTTTACCTGTTTTAA
TTGAATTATTTATTTTCATGTGGATCTTATCTGGTTGGAGTAGCGGAGCC
TATGATGTGGAGATTGGTATTTTACGATATGTTAATTATGCATCATTTC
GTCCTTTACAGAAATAGGTTATAACTCTTTGATTATTGCCGCACATAGTA
TTGGAATGAATTATAGATTATTTTTTTGTTATGTGTTGTTTATTGAAATG
GTAATAATGTTTTGGTTTTGTTGAAAAAAATTCAGTTAAATCACCAATCGT
TTTTGGATTATTTTTAATATATCCGTCATTTATTTATTTCCAATATATTC
GGAATATATTTGCATTTACGTTCTGTTACTTATTGCACTGGATGCTTTAATT
AATAAGAAAAAGGGCTATATAATCAAATATATCATCTTTATAGTTTTAGC
TACTACAATACATGCTAGTTCTCTGTTCTTTTTGCTGTATTTACCGATTA
GTTTTATTAAACAAAAGACAGCGATAATAACCGTAATGGTCACAGCGATA
TTGCTTTATTTTTTTCAGCAGGAATTTTACAGTTTTCAAATATAATAACTAG
CTTAGTCGGACAAGAAAAGACTGATATTGTTACTGCGCACAACTAATG
CAGAAGGTGGAATAGGTAGAATATTTGGATTAGCATTTAGTATTTGACT
TTCTTCATTATATTCATTATTCTAAAGTATTTCTTTAAGATATCTATGAA

AGGAGATACAGTAAGGACCTTTGTTAATATTAACCTGCTATCATTATTT
TTATTCCATTAACGCTAAACTTTGGGGTTGGTTTTCGCTAGAATTCCAACG
CTATTGTGTATTGTTAATTATGTATTCTTAGTAAATAAAATTAGTGAAGT
AGAATCTCAGAAGCAGCGTTTAATTATTTACTTCACACTAGCATTATTTT
TAATAGGTTCTATGTTTCTAAATATTAGAAATATAGAATACAGACAATTG
GTTTTTTATCCTTTTTTTAATAATAATGAACTAATGAGATGGCTATTTTA
TTAAAAATTCTATACTTGAAAGTGAGTTCGAAAACAAAAACTGAAAGTG
AGGAGATTTAGCTAGAATGGACATTATGTAACTAGCTTAAAAATGCACA
ATAAAAAGGCCTACCCAATTGAGGATAGACTTTTTTTACTTTATTCAGCTT
TGTCATCTACTTTAATCTCAGCACTAGTTGAGGTCACATTAGAAACGTTT
GCACTAGTTGGTGCTTTATCAGCTCGGCTAGCGGAGTCCACCTCGTTTGT
AACATGTTCTAAGGTGCCTGTCTGTCTGTGAGACGTTTACAGTTTGTA
CGTCTGTAATTCACCTAGCATACCTAAAAATGGTCAGAACCCTGTTAATGG
TAGATTGCAAATTTAATCCAGTATCTGAATCTAAAACTGATGATGTCTCA
AGTATGAGTGTGGTGAATGATCACATAAAAAATCGTAAAGTTTGTCTATAT
TGGTCGGGTGATGTGGGAGGGGCAGAAAAATTTAGCCGAATTATTTTCTG
CCCTTGATAAGGTGTCTGGAAATTGGCAGTTAGAAATTTTCGGCACAGGG
GACGCAGCGGAGATAGATCATGTTAAGAACTTCGTCAGCAATCACCAATT
AGAAAAGCATGTAATTATACGTGGTTGGGTTGCAAAGCCATTTGACAACC
TTGAATGTGATTACCTAGTATTGACTTCCAAGTACGAAGGTCTTCCGATG
GTTTTGATTGAAGTTCAGCAACATGGGATTGCATGTATATCAGCGAATTG
TCCCACCGGTCTCGACGATATCATTACGTTGGAGAGTGGTTATTTGTATG
AACCGGGCGATATTGATCAGCTATCAGGAATCTTGCAACGGTGCATTGAC
GCACCAACAGTACCATTTGATCCGAGAAAAGATTTCGAGCGCTGTGAGTCG
TTTTCGCTGAAGGTAACATTTTCGATAATGTCGAGCGAAGTCTAAACATGA
TCAATACGTGCAACAGGAAAGGTTGAGCATGGCCAAGGAAAAAGTAAAAA
AACTAGCGAGCAACTTAGGCATGTTTGCCATTGGAAATCTAGGAAGCAAA
TTAATCAGCTATCAAAAGGTAAATGAAAAATCTTGAATTGCAGTCAATAG
GTGAGATCGCTTCTTGGACTTCAATTGTAAAAATCAACCAATGCGATGTTA
TATTTGATGATAGATTGTATTTAATAGCGTTAGTTAAAACGTGTTTTAAT
CTTGTTAATTTTTGGAGAGTGAATGATGGATCAAAACAGTAAGTTTTGTCTT
TTTTATCCGGCTTGTTTCGTAAATACTGGCTTACAATCGTTAGTTTTACAG
TGGCGGGATTAATAGTTGCCGCAGGGTTGACCTTCTTTGTAATTACACCT

AAGTACCAATCAAGTGTCCAGATTTTGGTTAACCGTAAAGATACTAATGC
CGCTACTGAGTATGCTGGGCAGCAGGCTGATATTCAGATGGTTACGACCT
ACAAGGAATTAATTGCTGGACAAGTGGTTTTAAAACCAGCTAAGCAACAA
TTAAGCAAACGTTATGGCATTGAGCGCTCACTAAGCACACTAAAAAGTGA
GGTTAGTGTGACAAGTACGGCTAACTCACAAGTTTTCTCAATCTCAGTGA
CTGATACTAATGCGAAAGCTAGTGCAGCATTGCCAATCAAATTGCTCGT
AGTTTTAAGAACCAAGTGCAAAAGATTATTAAGTTAACAACGTCACGAT
TGTTGCTCCAGCCGAAACGCCAAATGGTTCGGTATTACCGAAAAAGCCTC
TTAATATGTTGGTTGGGTTAGTTGCAGGATTGTTACTAGGATTTGCTTAT
GCAGCGATTCCGGTGCTCACTGATCGTCGCGTTCACGACGCTGATTTCTT
AACTGATGAATTAGGATTGACTAGTTTAGGCTTGGTTAACCATCAACATC
ACTATTCAATGAAGAAACAGGCCTTGAATCTGAATGGTGGCTATCATACG
CATAATGATCGAACATCGTCACAAGCGATGAAACGAGTTTAGGAGGGTGT
TAGATGTTTTAAACGTAAAGAACAGAATATAACGACTACGGCATCAATTAA
TCTCACGACGATTAATGAACCCACGTCGGTCATTACTGAGCAGATTA
CAATTCGAACCAATATCAATTTTGGCGTACTGACAAAAATTTACGAACT
TTAATGGTGACTTCATCGATGATTGGTGAAGGTAAGTCAACAGTAAGTTG
TAACTTGGCGGTGGAATATGCTAAGGAAGGGATGCAAGTTTTATTGGTTCG
ATGCTGATTTACGGCGACCAACGATTCACACGACGTTCCGGCTTGAAAAT
CATAAGGGATTAAGTTCATGGTTGGCTAATCAAATGGACAATGTGAATGA
TGCAATTCATCCCGTTATTGGTAACCTATTCGTGATGACGAGTGGTCCGA
AGCCACCTAACCCAGCCGAACTATTGGGTAGTAACAAAAATGACTGAATTT
TTGACTTCCGGCAACCGTAAATTAGATTTGGTGATTGTTGATGCACCACC
AATTTTCCGGTGACTGACTCACAACCTGTTAGCAAATAAAGTAGACGGCA
CAGTTTTAGTTGTTCCGGCAGGGTGTGGCACAAAAAGCAGCGGTTACGAC
GCTGTGAATTCGTTGAAAAAAGCGCAAGCTAATATTTGGGTGCCGTCTT
GAACGATGTCCGTGATGGTTCTCATCATGGTTACAACAGTGGCTACGGGT
ACTACAGCGATGAAGATAGATAATTTAGTTGACTTACATTGCCATATCTT
ACCAGCCATTGATGATGGTTCACCTTCCTTAGAAGCGTCATTGGAATTGG
CACGGCAGGCAGTTGCTGACGGGATTCGCTATATTTTAGCGACACCACAT
CATATGGATCGACACTATCTCAATCATGCAGGTGATGTGTCTGCAGCGGT
TAAGGCATTTCAAGCAGAGCTAGATGCAAAATGATATTCGGTTAACCATTT
TTCCTGGTCAAGAGGTACATCTAAATGGTCAGTTGATGGAAAAATGTTGAT

GATTTGTTGGGCATAGATGCCAGTAGACACTATTTACTGTTGGAACCTCC
TCACGAGATGGTACCAAGTTATTTGGATGAAATGATTTTTCAATTGTCTT
GTGAGGGGATTACCCCAGTTATTGCACACCCTGAACGGAATGCTCAAATT
ATTGCTGAACCGCAACGATTATACAAAGTTGGTCGAGGATGGGGGCTTGGC
ACAGGTTACGGCCACGAGTTTAGTTGGTGCTTTTGGGGAACAAGTCCAAC
GTACTGCAAAAAGAATTCGTTAAGTGTGGTTTGGTTCAGGTGGTCGCGTCG
GATGCGCATAACGCTGAAAAATCGTGGTTTTGCAATGACGAAGGCCTATCA
AGTATTAAACGAAATGGATTCCCAATATCCTGAACGTTTTGCAACCAACG
CTCGGAATTTGCTGAATGGTGAGCAGATTGCTATTGGAAGAGTGGTAGTG
CCTGAAAAGCAGAAAAGTTTTGGCTGCTTTAAGACAGATTGTTTAATTA
TGAGACAAATAGCTTTAACGCAGTAATTATTGATTGAATGCATATTTAAC
GGGGTGCGGTTATTTCTTAATGGGAGAAAAGGGAAAAATTTCCACAAGCTA
AAATATAGGGAGATAAAAATAAGGTCAATTTGGACTTACGAGTGTAATAA
ATCTTGTATCACTAGCCTAAAAACAAGATTTTAGCGAAGTCTTTCCACCA
CACTCCATCGCAAGCTGCTAGCTTCATTTAAGAAGGGTATGCGCTATTAT
ATAAAGGGATCAGTTAAACCTCTGGATGGGGTTCTGAAAAATAACGAT
TACGTTATTTTACATATCTAGTATATTAAAGACGAACAGGATAGATAAC
ATCTCATCCCTGTGAGTTGCCATTTGAAATAATATGAGGCAAGTTCTAT
AACTAATTTGGATTCAATTTTTGCTTAACTGCCCCGAAGGAAAGGTTTATT
ATTAAGGTAGATTGTAAAATTAATCCGAACGCTGTTCCGGACAAAAAAGAT
CAGCTTCCTTTAAAATGGTGTTTACCACAAACCCATCTTTTAGGAGCTGA
TCTTTTGTCTAGTATAACCTATTCCGAACGAATTAATAATCGAAACCTTTT
GTGAACTAGGGCTGTCCAATATCCAAATGGGCGTTCGGCTGAACCGATCA
CCGTCAACAATTTCTTATGAATTATCTCGATGTCAACCTTATCAGGCTGA
ATTAGCACAAACAGATGCCGAATACAAGCGATCACGATGTGGTCGGAAAA
CTAAGCTGAGCGATGGGTTAAAGCAAAAAATTTCTCAACCATTTACGTCTA
AGCTGGTCACCAGGAATGATTGCTCACGAATTTAAACTAGCTACTAAATC
TATTTATAATTGGCTAAATCAGGGGAGAATTGGTTTCTCCTTGAATGATC
TACCTGAACATGGCGTACGCCAACGGCGTAACGTTGACCAACGATCCAAA
TATAATCAATCTTTGGGGCGATCAATTGAACAGCGTCCCATGATGATTAA
TCAACGTAATCGCATCGGCGATTTTGAACCTAGATACAGTCGTTGGTCCCTC
GTGGGCATAGTAAGGCAGTTTTATTAACCTTAATCGATCGAAATCACGG
TTCCTTTGGGCATACCGGTTAAAAGATCGGACGACAGCGACTGTTAATGA

AGCACTAACTAAGTTCCTAACCACCTTTTAATGGTCCGGTGCACAGCTTTA
CTGTGGACCGTGGCACTGAGTTTAGTGGGCTAGTATCACTTGAATCACAA
TATGGTATTAAGACCTATTACTGCCATGCTTATACGCCAGCTGAACGTGG
TAGTAATGAACGCTTTAATCGGAATTTACGTTATTTTTATCCTAAAGGGA
CTCGTTTTGAGCACATTAGTGCTCAAGATTTAACGACGACGTTACTCCAA
ATTAACCAGCGACCGCTTAAAATACTCGACTGGCAAACACCGTATCAGGT
TATGCTGACAAATTTGTCCAAAAATTCGGATTAAATTTGCAATCTACCTT
AAGTTAGTTATTTTTAATCTGATTTTTTATTTAATTGTTGACTATTTACAC
ATGTTGTTAGTTTCTTCTATCATTAGGTAGTAATATTTTGAAAAAGAAA
TATAATTAATAAGCAACTATTCAGGGGGCTCTAAATGAAAGGAATTA
TTCTTGCAGGGGGATCCGGTACACGGCTGTATCCAATTACACGGGCGATT
TCAAAACAATTGATCCCGATTTATGATAAGCCAATGATTTATTATCCGTT
ATCGACGTTAATGTTGGCAGGAATTCAGATATTTTGGTTATTTCAACAC
CTGTTGATACACCACGGTTCAAAGAAGCTGTTAGGCGATGGTCATGATTTG
GGCTTGAATCTATCCTATGCTGTCCAAGAAAAGCCGAACGGTTTAGCTGA
AGCTTTTTATTTTGGGTGCTGATTTTATTGGAAATGATTCAGTCTGTCTTA
TTTTAGGTGATAATATTTATTATGGTGGCGCTTATCCAAGATGCTTCAA
CATGCTAGCGCTAAGCCGAAGGGGGCCACGGTCTTTGGTTACCATGTCAA
TGATCCGGAACGGTTTGGTGTGCTTACTTTGATGAAAATATGCATGCAA
AGTCCATTGTTGAAAAGCCTGTACACCCAGCTAGTAATTATGCTGTCACG
GGAATGTATTTTTATGATAATCAAGTCGTTGATATTGCGAAGAATATTCA
GCCATCACCACGTGGTGAATTGGAGATTACGGATATCAACAAAAGTTTACT
TAGAACATAATGAGTTAGATGTTGAACTCATGGGCCGTGGTTTTGCTTGG
CTTGATACTGGGACCCATGACTCATTACAAGAAGCAAGTAGTTTTATCGC
AACCGTGCAAAAACGCCAGAACTTAAAAGTGGCTTGCTTAGAAGAAGTGG
CGTATCGAATGGGTTATATTGATGCTGATAAAGTGTATGAATTGGCGCAA
CCATTGAAGAAGAATGATTACGGTCAATACTTATTAAGATTAATTGGGAG
GGCTTAAATTTTTGGGCAAATTAAGGTAACAACGACTAAGTTACAAGATG
TTAAGATTATTGAACCAGCAGTTTTTGGTGACAAGCGGGGTTCTTTACG
GAACTTACTCTGACCGTGATTTCAAAGAAGCTGGAATTGATTTTGATTT
CATTACAGGATAATCAATCATTGTCAGCGGAAGCGGGTGTTTTGCGGGGAC
TGCATTTTCAACGTGGCAAGGCAGCGCAAATAAATTAATTCGCGTGGTG
ACTGGTGCCGTGCTCGATGTTATTGTGGACGTTTCGTGCTGGCTCACCTAC

TTACGGTGAGTGGGAAGGCTACATTATCTCTGAAAGTAACCACCGTCAAT
TGTTAGTCCCCCGTGGTTTTGCCCATGGCTTTGTGACATTGACTGATAAT
GTTAATTTCTTATACAAGTGTGATAACTACTACAACGCTGAAGCCGACGG
TGGTATTACCTTTATGGATAAAGATTTAAATATTAAGTGGCCTATTGACT
ACGATCAAGCTATTACTTCTGAAAAGGATGCTAAACAACAGACCTTCAAA
GAATTTGAACAGAATAATCCGTTTTGTTTACGGCGAAATTTAAGGAGACGT
CATGGAAAACCTATTAGTTACCGGTGGTGCCGGCTTTATTGGCTCTAACT
TTGTTCACTATGTTTATAATCATCATCCCGAAGTCAAGATTACCGTATTA
GATAAGTTAACTTACGCTGGTAATCGGGCCAACCTTGGAAAGAAATTTCTAGG
CGACCGGGTTAAATTAGTTGTGGGTGACATTTGTGATGCGCCCTTAGTTG
ATGAATTAATGCAACAAACTGACGCGGTTGTCCATTACGCCGCTGAAAGC
CATAATGATAATTCATTAAGGGATCCATGGCCATTCATCGAAACGAATAT
TATCGGGACTTATACGCTGATCCAGTCCGCACATAAGTTTAATAAACGCT
TCCACCATGTTTTCCACTGATGAAGTATACGGTGATTTACCATTACGGGAA
GACTTACCGGGCCATGGTGAGGGTGTGGCGAGAAGTTTACACCAACTAG
TCGTTATAAGCCTTCCAGTCCATACTCTTCGTCTAAGGCCAGCAGTGATC
TTTTAGTTCGGGCTTGGGTACGTTTCGTTTGGCTTACAAGCCACCATTTTCG
AACTGTTCAAATAACTATGGCCCTTATCAATATATTGAGAAATTTATTTCC
ACGCCAAATTACCAATATTTTAAGTGGGATTCGGCCAAAATTTATATGGTA
GTGGTAAAAACGTTTCGTGACTGGATTACACGAACGACCATTCTGCGGCC
GTTTGGGATATTTTAACCAAAGGTAAGATTGGCGAGACCTACCTGATTGG
TGCCGATGGCGAAATGAACAATAAGGACGTCTTGGAAATGATTCTTGAAT
TAATGGGTACGCCTAAAGATGCTTATGATGTTGTTAAGGACCGTCCCGGC
CATGATTTACGTTATGCGATCGATTCAACTAAGTTGCGCACGGAATTAGG
TTGGCAGCCAGAGTTTACTGACTTCCGGTCTGGTTTGAAGCAACGATTG
ATTGGTATACTGACCATCAAGACTGGTGGCAAGCAGATAAGAGCAAGGTT
GAATCAAACACTACGCCAAGAACGGGCAATAATAGTGTGAAATGCTAGAGGA
GGAGGTTTCTAAATGTCAAAGTAATGATTGTTGGTGCCAATGGTCAATT
GGGGAATGAGTTGCAACGACTATTAAATGAACAAGGGATTGCATTTGATG
CACTGACTAAAAAGAATTGGATGTCACGAACCTAGATGCAGTCAAAGCT
AAGGTTGCGGAATTACAACCTGTGGTCTTATATGATTGCGCAGCTTACAC
AGCAGTTGATAAGGCCGAAGATGAAGGCAAAGCCCTCAATTGGCTGGTCA
ATGTTGATGGAACAAAAAATTTAGCCCAAGTAGCAGCTGAACAGGATGTT

AAATTGGTTTATGTTTCTACTGACTACATTTTTGATGGCACTAATAAAGG
TGAATATTTAGAAGATGATCCAGCCAACCCCAAGAATGAGTATGGGCGTG
CTAAGTGGGCTGGTGAAGAAGCCGTTTCGTCATAGCGGTGCTGATTACTAT
ATTGTTTCGGACTAGCTGGGTTTTTCGGTGAATTTGGGCATAACTTTGTCTT
TACAATGCAGAATTTAGCAAAGACGCATGACAAGTTGACAGTCGTC AATG
ATCAACTTGGACGACCAACCTGGACGCGAACATTAGCAGAATTTATGGCC
CACCTGGTGAAAACCTGAAGCCGCTTCAGGGACCTATCAATTAAGTAACGA
TAATACAGCCACTTGGTATGACTTTGCGAAGGAAAATTTGAAGGATACTG
ATGTGGAAGTAGCGCCGGTTACTTCTGAACAATTTCCACAAAAAGGCTTAC
CGGCCACAGCATTTCAGTGATGAATTTGGATAAGGCTAAAGCAACTGGTTA
TAAGATACTAACCTGGCAAGATGCATTGGAAAAGATTTGAACAAGAATTAG
TATAGAGATCATTAAAGACGGTACAGAATTAGCTTGATTGTACAGAATCT
TATAAAATGAAGCGAATTTAGTTAAAAGTGGATAGTAGTAAAAAGAAAA
CTTCTTATCATAAATATAATTTTTATTATGTTAGGAGTTTCCAGAGATT
CTGAAGTTGCTACATCTGAAGTCGAACAGGATTTTCTTTGGTCAGACAAA
CGCGTACAGACTTATCATTTAGTGACTTAGCTAGAATTATTACAGAGGGG
CAACTAAAAACATTGTCTCTGATTATGCTCAAGGCACTGGAAAATGATTA
ATGGATAGTCTATTTTAAATAGTCTCACAAAAATAAAAGCAATGTGCTAC
TAATGTTTTACGTACTTGTTTAAAGTTACAGAGGGCGGACTAGATCTCA
GTTTGCTAATAAATAATATTTTCTAAATTATATAAAATAAATTGTTAATTT
ATGAATGGAGTAATGTTGATATGATTTATGCTCAGATTTTAGCTGGCGGT
AAGGGTACTCGCATGGGGAACGTCCCAGTGCCTAAACAGTTTTTTGACCTT
AGCAGGCAAGCCAATTTTAATTCATACCGTTGAAAAGTTTGTACTGGAAA
GTCGCTTTGATGCGATTTTAGTTGTTTGCCCTGCCGACTGGTTGAGTCAC
ACACAGGATCTAATCAAAAAATACATCTCAGACGAACGAGTTCACGTGGT
TACCGGTGGCTCTGAACGTAACGAAACTTTGATGAAGGGTATCGACTACA
TCCAAGAAAATTATGGTAGCCACGATGATGATATCGTCGTGACTCACGAT
GCCGTACGGCCTTTTATCACGCAACGTATCATCAATGATAATATTGAAGC
GGCTTTAGAGCACCCAGCAGTTGATACGGTAGTGCCAGCTATTGATACGA
TTGTGCAAGGAACAGAAGGCAAAATCGACGATATCCCAGTGGCTTCAACT
ATGTATCAGGGGCAACACCACAAAAGTTTTAATATCAAAACACTAGTTGA
ATCTTACAACGCCTTAACTGATGCCAAAAGGAAACTTTGTCAGATTCTT
GCAAGATTTGCTTGTTAGCAGGTCAAGAAGTGACCTTAGTGCGGGGCGAA

AACTATAATTTCAAGATTACAACGCCCTACGATTTAAGAGTTGCTTCTGC
TTTAGTAGAAACGAGGGACTAATATGTTAAATCAAGTTTATCGCTTAGTA
GATCCTCGTCAGTTTGAAGTGCAAACCTGTTGCTGAAGAGATCACCAATAA
TGATATTATTGTGCGGCCACGCTTTTTTATCCGTTTGTTCATGCGGATACTC
GTTACTTTACGGGTCAACGACCACAAGCGACCTTACGGCAGAAATTACCA
ATGGCGCTCATTACGAAGGCGTTGGTGAAGTCGTCAAGGATCCTCAAGA
TAAATTTAAGCCAGGAACATTAGTGGCAATGGTACCCAATACTCCGTTTG
AAACAGATCCCATCATTAAAGAGAACTATTTACCATCTTCTAAGTTCCGT
TCCAGTGGTTATGATGGCTTCATGCAGGAGTATGTGAGTCTGCATCGGGA
CCGTGCGATTGTCTGACCAGATAACTTTGATCATCAAATGTCTGCTTTTA
TTGAAATGGTCTCAGTTGGTGTTCACGCGCTCACACAATTAGAAGGCGTC
ATGGATGCTGATCGTAAAGTCATTGGCATTGGGGCGATGGTAATTTAGG
ATTTATTACCGCAACCCTTGTCAAGCAAATTTTTCCAGACAGCCAACTCA
TGATTTTTGGGCGCCATCAATCTAAGCTCGATTATTTCTCATTGTCTGAC
AAAACCTATTTAGTTGATGATATTCCGAATGATTTAAAGGTCAGCCAAGC
ACTAGAATGTACTGGTGGCCGGGGAGCGAATCAGCAATTGCGCAAATCA
TCCAGCATATCCGACCGATGGGGACGGCCATTTTGATGGGCGTCTCAGAA
GATCCAGTTGGCATTGACACGCGTTCCGTGCTTGCAGAAGGCTTAACACT
ACGTGGCGTAAGCCGAAGTGGTTCGCGCTGATTTTCAACGAGCTGTTGATA
TTTTGACGGATAGCCCCGTTACGCGGGAACGGTTGCAGAATTTAGTGGGC
TTCACCTCGCAAGGTCAGCACAATCCAGGACATCACTGATTTCTTTGAAGG
GGCCTTAACCAACTATTGGGGCAAGGCGGTGATGGAGTGGGACGGTTAAA
AGATGTTTTTCTGGAAATTTGTATTAATACAGATTACCTGTTTTTCAAAA
TACATGAGGACAATATTTATAATGTAATCACTGGTTCGTTCTTAGCAAGAT
GAGGTGCCATATTCGTTTTAATTATTTGGTGTATGATATCAAATTTGT
GATCTCTAGTAGTTGTCTGAGATGCTATTAGTTACGAGTTGTGTTTTCAT
GTTACAACCTGTAACCTGAATTGATACGGCAGCAGGAAAAATGGTTGAAACA
AAAATTACAATCTATACTTATTAACCTTTGGTAACTAAATAAACGTTTTGT
ATTTTGAATCGTCGTACTIONGATTAGATGGTTGAAAGTAATTAATTAGTAA
GTGGCAAATAAATTGGTTATCAGTTGGACTGATGGAGCGTCTTGACGTT
TTAAAAGTTGTAACAGTATCACTTTGAACGATGATTTTATGATTTTTGTT
TCAGGTAAACGGTAGATTGCAAATTTAAACCGAATTTTTTGACAAATTGG
TCAGCATAACCTGATAAGGTGTTTGCCAGTCAAGTATTTTAAGTGGTCTC

TGATTAATTTTCGAGTAAGGTGGTTTTCAAGCCTTGAGCACTAATGTGCTC
AAAATAAGTCCCCTTAGGATAAAAAATAGCGTAAGTTCCAATTAAATCGTT
CATTACTGCCGCGCTCAGCTGGCGTATAAGCATGGCAGTAATAGGTCTTA
ATACCGTATTGTGCTTCAAGTGATACTAGACCGCTAAACTCAGTGCCACG
GTCCACCGTAAACTATGCACCGGGCCATTAAAAGTTGCTAGAACTTAT
TTAGGGCTTCATTAACAGTTACTGCTGTCCGGTTTTTTAATCGGTAGGCC
CAAAGGAAACGTTATTTGCGATCGATTAAGGTTAATAAAACTGCCTTACT
ATGCCACGGGGGCAACAATTGTATCTAATTCAAAATCACCGATGCGAT
TACGTGATTAACCACGATGGGTGCTGTTCAATTGACCGTCCTAATGAT
TGATTATATTTAGAACGGTGGTCAAGGTTACGCCGTTGGCGCACGCCATG
TTCAGGCAAATCATTTAAAGAAAACCTCAATTTTTCTTGATTTAACCAAT
TATAAATTGATTTAGGCGCTAGTTTAAATTCGTGAGCTATCATTTCTGGT
GACCAACTTAGTCGTAAATGGTTTTAAAATTATTTGCCTTAATTTGTCATT
CAATTTAGTCTTTTCGGCCACATCGTGACCGCTTGATTCGGCATCTGTTT
GGGCCACTTCGGCCTGGTAAGGTTACATCGAGCTAATTCATAAGAAATT
GTGGCAGGTGATCGTTTTAGGCGATCGCTCATTTGGATATTGGACAGGCC
TAGTTCACAAAAGGTTTTGATTTTAATTCGTTCAGAATAGGTTATACTAG
ACAAAAGATCAGCTCCTAAAAGATGCTCCTATGTCAATAAATGGCACATC
TTTTTCTAAACACTCGTTCTAATTCTGTGCGAATTAAACCAACTGATGTA
ATTTGAGGTTTCGGATTACCAAGTCCTCAAAATTGGAAAAAGTTGTTTGAA
AGGCAAACCTCTCTTCAACAATGAGTGAAAAGCTTCAATTGGCCCATTA
TCATAAGGATAACCTTGTTTTGAGTATGAGTGGCTAATCTGATGCCGTTT
AAGTAAAGTTTCAACTTCGTTGCTGGTGTACTGTGAACCCATGTCAGAGT
GAAAATATTGTGGCTTTTGATGACATTCAAGCGCCTGATTAATCGTTTCT
ACAACCTAACGTCGCCTCCATCTGACGACCAATCTTGAAAGCAAGGACTTG
ATGAACCTTTGGTTCGTAAATAGAACTGAGATAAACCCAGGTTCCCTGGAC
GTAATTCCAAATAAGTAATGTCAGCACGCCATATCCTTGCAATGGGCTGG
TGCTTGATTAATTTGGGGCGTTGTGAATGATCCACATGAGTGCCAGGTTT
TTTAAATCGCCGATTCATTAAGAGTGAATCTCCATTTCCCTCATTAATC
GTAAAATTCGTTTTGACCCAACACAGATGCCTGACTTGCGAAGCACCATC
GTTATTCGTGGATAACCATAGGCACGATAATTATTTCCCAAATCAATTT
AATTTTTTCTTTGAGCTGATTATCAACACGTTTCGTGTTGACTAGGTTGAT
ATCTTTTCCAATGGTAATAGGTGCTGCGCGGTAATTTTCAGTGCCGAAAGA

ATAATTGATAAGCGGTGTCGCAATAACTGATCTTCTATGAAGACAAGGCA
ATTAATTCGTCCCTAATGCTTTCCCAGTAACACCGCCGAGCTTTTAAAAT
TTCAAGTTCCTCCTTTAATCGCTGATTTTCCTTTTGAAGTTGTTGAATT
CTTTGGACGTTACTTAAGGACCGTCTTCTAGCTCAACTGATTTAGCGCCT
TTACCTTTTAAAAGGATTGCGGCTGGAGAAACACCGATTCTTCGGAAAGC
GAGCGAATAGATC

BIOGRAFIJA

Milica Nikolić je rođena 22. januara 1980. godine u Beogradu. Diplomirala je 2004. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 9,43. Iste godine je upisala poslediplomske studije na Biološkom fakultetu, smer Molekularna genetika i genetičko inženjerstvo i te godine je zaposlena kao istraživač pripravnik u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. U istoj laboratoriji je uradila i magistarski rad, a magistarsku tezu pod naslovom: “Molekularna karakterizacija mikroflore kozijeg sira i fenotipska i genotipska identifikacija predominantnih bakterija mlečne kiseline“ odbranila je 15. novembra 2006. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Za magistarsku tezu je dobila prvu nagradu Srpskog biološkog društva. Od 2008.godine radi kao istraživač saradnik u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu. Ima šest objavljenih radova u časopisima međunarodnog značaja, jedan rad u časopisu domaćeg značaja, kao i deset kongresnih saopštenja. Objavila je i jedan rad iz doktorske teze: Nikolic, M., Jovcic, B., Kojic, M., Topisirovic, L. 2010. Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. *Europ. Food Res. Tech.* 231:925-931. Tokom svog rada bila je uključena u tri nacionalna projekta kao i jedan međunarodni projekat. Bila je dva puta na stručnom usavršavanju u Instituto de Productos Lácteos de Asturias, CSIC, Villaviciosa, Španija, pri čemu je prvi boravak od februara do maja 2009. godine bio finansiran FEMS stipendijom, a drugi boravak od aprila do jula 2011. godine je bio u okviru programa naučne i tehnološke saradnje između Republike Srbije i Kraljevine Španije, 2010-2012. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije, ima FCE sertifikat iz engleskog jezika, govori francuski i španski jezik.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милица Ј. Николић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Карактеризација површинских молекула бактеријских ћелија одговорних
за потенцијалну пробиотичку активност природних изолата лактобацила**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанта

У Београду, 26.03.2012.

Милица Николић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Милица Николић _____

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада **Карактеризација површинских молекула бактеријских
ћелија одговорних за потенцијалну пробиотичку активност природних
изолата лактобацила**

Ментор др Наташа Голић и др Бранко Јовчић

Потписани _____ Милица Ј. Николић _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанта

У Београду, _____ 26.03.2012. _____

_____ Милица Николић _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Карактеризација површинских молекула бактеријских ћелија одговорних за потенцијалну пробиотичку активност природних изолата лактобацила

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанта

У Београду, 26. 03. 2012.

Иванко Јелић

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.