

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Anja MAVRIČ

**VPLIV SEVA *LACTOBACILLUS GASSERI* K7 IN
NJEGOVIH BAKTERIOCINOV NA ČREVESNO
BARIERNO FUNKCIJO IN VNETNI ODZIV *IN*
*VITRO***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Anja MAVRIČ

**VPLIV SEVA *LACTOBACILLUS GASSERI* K7 IN NJEGOVIH BAKTERIOCINOV
NA ČREVESNO BARIERNO FUNKCIJO IN VNETNI ODZIV *IN VITRO***

DOKTORSKA DISERTACIJA

**INFLUENCE OF THE *LACTOBACILLUS GASSERI* K7 STRAIN AND ITS
BACTERIOCINS ON INTESTINAL BARRIER FUNCTION AND IMMUNE
RESPONSE *IN VITRO***

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Doktorska disertacija je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študijskega programa Biomedicine, s področja Mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani ter na Kemijskem inštitutu, Oddelku za biotehnologijo.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepu Komisije za doktorski študij z dne 19.9.2012 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicina, področje mikrobiologija. Za mentorico je bila imenovana viš. znan. sod. dr. Bojana Bogovič Matijašić in za somentorico prof. dr. Mojca Narat.

Mentorica: viš. znan. sod. dr. Bojana BOGOVIČ MATIJAŠIĆ

Somentorica: prof. dr. Mojca NARAT

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Irena ROGELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Alojz IHAN
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Maja Rupnik
Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta

Datum zagovora:

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

Doktorandka:

Anja Mavrič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 579.864.4:615.331:577.27(043)=163.6
KG probiotiki/*Lactobacillus gasseri* K7/bakteriocini/gasericin/celični modeli/Caco-2/THP-1/tesni stiki/citokini
AV MAVRIČ, Anja, univ. dipl. biol.
SA BOGOVIČ MATIJAŠIČ, Bojana (mentorica)/NARAT, Mojca (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina, področje: mikrobiologija
LI 2015
IN VPLIV SEVA *LACTOBACILLUS GASSERI* K7 IN NJEGOVIH BAKTERIOCINOV NA ČREVESNO BARIERNO FUNKCIJO IN VNETNI ODZIV *IN VITRO*
TD Doktorska disertacija s področja mikrobiologije
OP XIII, 123 str., 8 pregl., 23 sl., 101 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI *Lactobacillus gasseri* K7, probiotični sev iz blata dojenčka, v svojem genomu vsebuje zapise za dva dvo-komponentna bakteriocina, gasericin K7 A (GenBank EF392861) in gasericin K7 B (GenBank AY307382). Glavni cilji raziskave so bili ovrednotiti izražanje 8 genov obeh gasericinov med rastjo seva v tekočem gojišču MRS, izolirati posamezne aktivne komponente bakteriocinskega kompleksa, ovrednotiti njihovo protimikrobno aktivnost in raziskati morebitni vpliv bakteriocinov in seva K7 na črevesno barierno funkcijo ter vnetni odziv gostitelja *in vitro*, s pomočjo celičnih modelov za črevesne epitelijske celice (Caco-2) in imunske celice (THP-1). Med rastjo seva K7 v gojišču MRS se je po 4 urah inkubacije izražalo vseh 8 tarčnih genov, v gojišču pa smo zaznali tudi protimikrobno aktivnost. Ko je bil sev K7 izpostavljen dejavnikom, značilnim za okolje želodca in črevesa, protimikrobne aktivnosti nismo zaznali. S postopkom, ki je vključeval izsoljevanje proteinov z amonijevim sulfatom, kromatografijo na trdnem nosilcu (SPE) z elucijo z acetonitrilom in 2-propanolom, ter visokotlačno tekočinsko kromatografijo z obrnjenimi fazami (RP-HPLC), smo uspeli izolirati en peptid dvo-komponentnega gasericina Gas K7 B, čigar aminokislinska sekvenca je homologna sekvenci peptida GatX, komplementarnega peptida gasericina T, ki so ga v prejšnjih raziskavah opisali kot neaktivnega. Izolirana aktivna komponenta gasericina K7 B je pokazala širok spekter bakteriocinske aktivnosti proti predstavnikom rodov *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* in *Clostridium*. Aktivna komponenta gasericina K7 B v preskušanih koncentracijah (2,5, 5 in 10 µg/mL gojišča) ni vplivala na transepitelijsko električno upornost (TEER) celic Caco-2, ki odraža trdnost medceličnih stikov. Sev K7 v koncentraciji 100 KE/Caco-2 je dvignil TEER intaktnih Caco-2 po 3 in 4,5 urah skupnega inkubiranja, kakor tudi celic, ki smo jim istočasno s sevom dodali PDB, da bi porušili celične stike. Sev K7 je vplival zaviralno na prerazporejanje proteinov tesnih stikov okcludina in ZO-1 izven celične membrane, izzvano s 25 µM PDB. Celice Caco-2 so izločale večjo količino IL-8, kadar smo jih tretirali samo s PDB, kakor kadar smo jim poleg PDB dodali tudi sev K7. Aktivna komponenta gasericina K7 B pri koncentraciji 10 µg/ml ni vplivala na izločanje tarčnih provnetnih citokinov (IL-1β, IL-6, IL-8 ter TNF-α) iz celic THP-1, nestimuliranih ali stimuliranih z lipopolisaharidi (LPS). V delu smo na celičnih modelih dokazali pozitiven vpliv seva *L. gasseri* K7 na črevesno barierno funkcijo ter vnetni odziv, ne pa tudi značilen vpliv aktivne komponente gasericina K7 B, ki smo jo edino uspeli izolirati.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 579.864.4:615.331:577.27(043)=163.6
CX probiotics/*Lactobacillus gasseri* K7/bacteriocins/gassericin/cell culture models/Caco-2/THP-1/tight junctions/cytokines
AU MAVRIČ, Anja
AA BOGOVIČ MATIJAŠIČ, Bojana (supervisor)/NARAT, Mojca (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biomedicine
PY 2015
TI INFLUENCE OF THE *LACTOBACILLUS GASSERI* K7 STRAIN AND ITS BACTERIOCINS ON INTESTINAL BARRIER FUNCTION AND IMMUNE RESPONSE *IN VITRO*
DT Doctoral dissertation
NO XIII, 123 p., 8 tab., 23 fig., 101 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Lactobacillus gasseri* K7 contains in its genome regions encoding bacteriocins gassericin K7 A [GenBank EF392861] and gassericin K7 B [GenBank AY307382]. The objectives of this study were to examine bacteriocin genes' expression, to isolate individual active components of bacteriocin complex, to determine their bacteriocin activity and to examine the possible effects of bacteriocins and K7 strain on gut epithelial barrier function and host's immune response *in vitro* on gut epithelial cell model (Caco-2) and on immune cell model (THP-1). All 8 target genes were expressed after 4 h of growth of K7 strain in MRS broth and antimicrobial activity was detected. When K7 strain was exposed to environmental factors of stomach and intestines, no antimicrobial activity was detected. The purification protocol including ammonium sulphate precipitation, solid phase extraction chromatography (SPE) and RP-HPLC resulted in isolation of one peptide of two-component gassericin Gas K7 B whose amino acid sequence matched the deduced amino acid sequence of GatX, a complementary peptide of gassericin T, previously characterized as inactive. The isolated peptide showed antimicrobial activity against representatives of *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* and *Clostridium*. Active component of gassericin K7 B (2.5 µg/mL, 5 µg/mL and 10 µg/mL of medium) had no effect on Trans Epithelial Electrical Resistance (TEER) of Caco-2 cells. K7 strain at concentration of 100 CFU/Caco-2 increased TEER in intact Caco-2 after 3 and 4.5 h of co-culturing, as well as in Caco-2 cells treated with PDB in order to disrupt the tight junctions. K7 strain reduced the redistribution of tight junctions proteins occludin and ZO-1 outside the cell membrane, induced with 25 µM PDB. Caco-2 cells excreted higher amounts of IL-8 when treated with PDB only, as if they were treated with both, PDB and K7 strain. Active component of gassericin K7 B (10 µg/ml) showed no effect on the excretion of proinflammatory cytokines IL-1β, IL-6, IL-8 and TNF-α by THP-1 cells, stimulated or not with lypopolysaccharides (LPS). In this work, the positive effects of *L. gasseri* K7 on the gut epithelial barrier function and inflammatory response was demonstrated using *in vitro* cell models. The putative effects on cell cultures of gassericin K7 B active component, the only component of bacteriocin complex that was successfully isolated, were not demonstrated.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 UVOD IN HIPOTEZE	1
1.2 HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 PREBAVNI TRAKT KOT EKOSISTEM	4
2.1.1 Anatomska razdelitev ter spreminjanje fizikalno-kemijskih razmer v prebavnem traktu človeka.....	4
2.1.2 Spreminjanje številčnosti in sestave mikrobiote vzdolž prebavnega trakta	5
2.1.2.1 Oblikovanje biofilma.....	6
2.1.2.2 Interakcije med gostiteljem in mikrobioto	7
2.1.3 Rod <i>Lactobacillus</i>	8
2.1.3.1 Probiotični laktobacili.....	8
2.1.3.2 Vrsta <i>Lactobacillus gasseri</i>	10
2.2 BAKTERIOCINI RODU <i>LACTOBACILLUS</i>	11
2.2.1 Uvrstitev bakteriocinov rodu <i>Lactobacillus</i> v klasifikacijsko shemo	11
2.2.2 Organizacija genov za bakteriocine razreda II	12
2.2.3 Regulacija biosinteze bakteriocinov razreda II	13
2.2.3.1 »Quorum sensing«.....	14
2.2.4 Mehanizem delovanja bakteriocinov razreda II	15
2.2.5 Značilnosti bakteriocinov razreda IIb.....	15
2.2.5.1 Bakteriocini družine laktacin F.....	16
2.2.5.2 Bakteriocini vrste <i>Lactobacillus gasseri</i>	17
2.2.6 Proizvodnja bakteriocinov - pomemben dejavnik probiotičnega delovanja	18
2.2.6.1 Vloga bakteriocinov pri naseljevanju seva v že naseljeno ekološko nišo	19
2.2.6.2 Vloga bakteriocinov pri zaviranju invazivnih patogenov.....	19
2.2.6.3 Bakteriocini kot signalni peptidi	19
2.2.7 Izolacija bakteriocinov	20
2.2.8 Uporabnost bakteriocinov v industriji in medicini	21
2.2.8.1 Testiranje citotoksičnosti bakteriocinov	22

2.3 VPLIV BAKTERIJ RODU <i>LACTOBACILLUS</i> NA VZDRŽEVANJE HOMEOSTAZE V ČREVESJU.....	23
2.3.1 Struktura črevesnega epitelijskega celic.....	23
2.3.1.1 Zunajcelične komponente črevesne pregrade.....	24
2.3.1.2 Celice epitelijske.....	24
2.3.1.3 Kompleks apikalnih stikov.....	25
2.3.2 Uravnavanje prepustnosti sloja epitelijskih celic črevesa.....	26
2.3.2.1 Proučevanje epitelijske pregradne funkcije <i>in vitro</i> - celični model Caco-2.....	27
2.3.3 Imunski odziv v črevesju.....	28
2.3.3.1 Glavne celice imunske obrambe v črevesju.....	28
2.3.3.2 Citokini.....	30
2.3.3.3 Celični model THP-1 za proučevanje imunskega odziva <i>in vitro</i>	32
2.3.4 Porušeno ravnoesje v črevesnem ekosistemu in učinek probiotikov.....	33
2.3.4.1 Mehanizem delovanja probiotičnih laktobacilov.....	34
2.3.4.1.1 Vpliv vrste <i>Lactobacillus gasseri</i> na pregradno funkcijo črevesnega epitelijskega celic....	36
2.3.4.2 Vpliv ostalih dejavnikov na prepustnost epitelijske pregrade.....	36
2.3.4.3 Vpliv bakteriocinov na pregradno funkcijo črevesnega epitelijskega celic.....	36
3 MATERIAL IN METODE.....	38
3.1 MATERIAL.....	38
3.2 METODE.....	40
3.2.1 Priprava inokuluma seva <i>Lactobacillus gasseri</i> K7.....	40
3.2.2 Metode ugotavljanja prisotnosti bakteriocinov.....	40
3.2.2.1 Priprava indikatorskega seva za testiranje bakteriocinske aktivnosti <i>Lactobacillus sakei</i> NCDO 2714.....	40
3.2.2.2 Metoda kritične razredčitve na mikrotiterskih ploščah.....	41
3.2.2.3 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti s »spot-test«-om na agarju.....	41
3.2.3 Analiza protimikrobne aktivnosti ter izražanja genov za gasericina K7 A in K7 B.....	42
3.2.3.1 Gojenje <i>L. gasseri</i> K7 v modificiranem MRS z dejavniki, značilnimi za razmere v prebavilih.....	42
3.2.3.2 Izolacija RNA.....	42
3.2.3.2.1 Obdelava z DNazo ter reverzna transkripcija.....	43
3.2.3.2.2 RT-qPCR.....	43
3.2.4 Proizvodnja, čiščenje in identifikacija gasericinov K7.....	45
3.2.4.1 Proces proizvodnje bakteriocinov v bioreaktorju.....	46
3.2.4.2 Izolacija gasericinov K7.....	46
3.2.4.3 Identifikacija izoliranega peptida z metodami masne spektrometrije.....	47
3.2.5 Primerjava protimikrobnih spektrov <i>L. gasseri</i> K7, supernatanta kulture ter izoliranega peptida.....	48

3.2.6 Proučevanje vpliva seva <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 in izoliranega peptida AcP na epiteljske celice in tesne stike na celičnem modelu Caco-2	50
3.2.6.1 Gojenje celic Caco-2	50
3.2.6.2 Priprava celic za merjenje TEER in imunooznačevanje za konfokalno mikroskopiranje	51
3.2.6.3 Priprava sevov, aktivne komponente Gas K7 B in PDB	51
3.2.6.4 Merjenje transepiteljske električne upornosti na celičnem modelu Caco-2	52
3.2.6.5 Imunooznačevanje proteinov tesnih stikov	52
3.2.6.6 Merjenje IL-8, izločenega v gojišče med gojenjem celic Caco-2 na apikalni in bazolateralni strani	53
3.2.7 Proučevanje imunomodulatornega vpliva izoliranega peptida AcP na celičnem modelu THP-1.....	54
3.2.7.1 Gojenje celične linije THP-1	54
3.2.7.2 Priprava celic THP-1 za poskus ter vzorčenje supernatantov	54
3.2.7.3 Priprava mikroorganizmov za poskus	55
3.2.7.4 Potek poskusa	55
3.2.7.5 Vrednotenje provnetnih citokinov z metodo »sendvič« ELISA.....	56
3.2.7.5.1 Merjenje vsebnosti izločenih provnetnih citokinov s komercialnimi kompleti reagentov.....	56
4 REZULTATI.....	57
4.1 IZRAŽANJE GENOV ZA GASERICINA K7 A IN K7 B TER PROTIMIKROBNA AKTIVNOST SEVA <i>L. GASSERI</i> K7	57
4.2 VPLIV DEJAVNIKOV, ZNAČILNIH ZA PREBAVNI TRAKT ČLOVEKA, NA PREŽIVETJE IN PROTIMIKROBNO AKTIVNOST <i>L. GASSERI</i> K7.....	61
4.2.1 Vpliv dejavnikov, značilnih za želodec, na preživetje in protimikrobno aktivnost <i>L. gasseri</i> K7.....	61
4.2.2 Vpliv dejavnikov, značilnih za črevesje, na preživetje in protimikrobno aktivnost seva <i>L. gasseri</i> K7	63
4.3 PRODUKCIJA BAKTERIOCINOV MED GOJENJEM SEVA <i>L. GASSERI</i> K7 V BIOREAKTORJU	65
4.3.1 Čiščenje bakteriocinov	66
4.3.2 Analiza peptidov z masno spektrometrijo.....	69
4.4 PROTIMIKROBNI SPEKTER SEVA <i>L. GASSERI</i> K7 TER IZOLIRANEGA AKTIVNEGA PEPTIDA GASERICINA K7 B	71
4.5 VPLIV BAKTERIJSKIH CELIC <i>L. GASSERI</i> K7 TER IZOLIRANEGA AKTIVNEGA PEPTIDA GASERICINA K7 B NA EPITELJSKO BARIERNO FUNKCIJO.....	73
4.5.1 Vpliv seva <i>L. gasseri</i> K7 ter izoliranega aktivnega peptida gasericina K7 B na transepiteljsko električno upornost intaktne celične kulture Caco-2	73

4.5.2 Vpliv seva <i>L. gasseri</i> K7 ter očiščenega aktivnega peptida gasericina K7 B na transepitelijsko električno upornost kulture Caco-2 s porušenimi tesnimi stiki	75
4.5.3 Razporejanje proteinov tesnih stikov (okludin, ZO-1)	79
4.5.3.1 Merjenje TEER celic Caco-2 na membranah	79
4.5.3.2 Vpliv seva K7 in PDB na razporejanje okludina	81
4.5.3.3 Vpliv seva K7 in PDB na razporejanje ZO-1	82
4.6 VPLIV SEVA <i>L. GASSERI</i> K7 TER IZOLIRANEGA AKTIVNEGA PEPTIDA GASERICINA K7 B NA IZLOČANJE PROVNETNIH CITOKINOV CELIC CACO-2 IN THP-1	83
4.6.1 Vpliv seva <i>L. gasseri</i> K7 na koncentracijo izločenega IL-8 celic Caco-2	83
4.6.2 Vpliv aktivne komponente gasericina K7 B na koncentracijo provnetnih citokinov v supernatantu kulture celic THP-1	85
5 RAZPRAVA	88
5.1 IZRAŽANJE GENOV ZA GASERICINA K7 A IN K7 B TER PROTIMIKROBNA AKTIVNOST SEVA <i>L. GASSERI</i> K7	88
5.2 ČIŠČENJE IN IDENTIFIKACIJA PEPTIDOV GASERICINOV K7	91
5.2.1 Identifikacija bakteriocinov	92
5.3 PROTIMIKROBNI SPEKTER IZOLIRANEGA AKTIVNEGA PEPTIDA GASERICINA K7 B	94
5.4 VPLIV SEVA <i>L. GASSERI</i> K7 IN AKTIVNEGA PEPTIDA GASERICINA K7 B NA CELICE CACO-2	96
5.5 IMUNOMODULATORNA AKTIVNOST SEVA <i>L. GASSERI</i> K7 TER IZOLIRANEGA AKTIVNEGA PEPTIDA GASERICINA K7 B	101
6 SKLEPI	105
7 POVZETEK (SUMMARY)	107
7.1 POVZETEK	107
7.2 SUMMARY	109
8 VIRI	112
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	Seznam indikatorskih sevov, uporabljenih za ugotavljanja protimikrobnega spektra <i>L. gasseri</i> K7 in izoliranega aktivnega peptida gasericina K7 B	49
Pregl. 2:	Seznam kratic, celotno ime ter poreklo različnih zbirk mikroorganizmov	50
Pregl. 3:	Protimikrobna aktivnost (AU/mL) v supernatantih kulture <i>L. gasseri</i> K7, inkubiranih 8 h v gojišču MRS, modificiranim z dejavniki, ki so značilni za okolje želodca.....	62
Pregl. 4:	Protimikrobna aktivnost (AU/mL) v supernatantih kultur <i>L. gasseri</i> K7, inkubiranih 8 h v gojišču MRS, modificiranim z dejavniki, ki so značilni za okolje črevesa	64
Pregl. 5:	Izplen protimikrobne aktivnosti med postopkom čiščenja bakteriocinov iz supernatanta kulture <i>L. gasseri</i> K7 z izsoljevanjem z amonijevim sulfatom, SPE ter RP-HPLC.....	67
Pregl. 6:	Specifična protimikrobna aktivnost [AU/mg] frakcij, pridobljenih po spiranju vzorca s precipitiranimi proteini iz supernatanta kulture <i>L. gasseri</i> K7 na kolonah SPE s postopnim višanjem % acetonitrila in 2-propanola	67
Pregl. 7:	Specifična protimikrobna aktivnost [AU/mg] frakcij po RP-HPLC	68
Pregl. 8:	Protimikrobna aktivnost kulture <i>L. gasseri</i> K7, nevtraliziranega supernatanta kulture K7 ter očiščene aktivne komponente Gas K7 B ..	72

KAZALO SLIK

Slika 1:	Homolognost primarne strukture peptidov, predstavnikov bakteriocinov družine laktacina F (Kawai in Saito, 2011: 180).....	17
Slika 2:	Mehanizmi delovanja bakteriocinov v črevesu (Dobson in sod., 2012: 5).....	19
Slika 3:	Shema postopka izolacije gasericinov	45
Slika 4:	Izražanje referenčnega gena za 16S rRNA med 10 h inkubacijo seva <i>L. gasseri</i> K7 v tekočem gojišču MRS	57
Slika 5:	Relativne vrednosti izražanja genov za gasericin K7 A med 10 h inkubacijo seva <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 v tekočem gojišču MRS	59
Slika 6:	Relativne vrednosti izražanja genov za gasericin K7 B med 10 h inkubacijo seva <i>L. gasseri</i> K7 v tekočem gojišču MRS.....	60
Slika 7:	Preživetje <i>L. gasseri</i> K7, izraženo kot log [KE/ml], v gojišču MRS, modificiranim z dejavniki, značilnimi za okolje želodca (pH=3, soli, pepsin)	62
Slika 8:	Preživetje <i>L. gasseri</i> K7, izraženo kot log [KE/mL], v gojišču MRS, modificiranim z dejavniki, značilnimi za črevesje (pH=8, žolčne soli, pankreatin).....	64
Slika 9:	Rast in protimikrobna aktivnost v supernatantu kulture med 8 h gojenjem seva <i>L. gasseri</i> K7 v bioreaktorju (pH=5,75, T=37 °C in z mešanjem 350 obr./min).....	65
Slika 10:	Kromatogram RP-HPLC, ki prikazuje ločevanje frakcije SPE, pridobljene po spiranju izsoljenih proteinov iz supernatanta kulture <i>L. gasseri</i> K7 s 40 % acetonitrilom.....	68
Slika 11:	Masni spekter (MALDI-TOF) frakcije F ₃	69
Slika 12:	Primerjava aminokislinske sekvence peptida GatX, izpeljane iz nukleotidnega zaporedja peptida GatX, domnevnega komplementarnega peptida gasericina T in peptida, izoliranega iz kulture seva <i>Lactobacillus gasseri</i> K7	70
Slika 13:	Vpliv različnih koncentracij seva <i>L. gasseri</i> K7 (10 KE/Caco-2, 100 KE/Caco-2 in 1000 KE/Caco-2) na TEER monosloja celic Caco-2	74
Slika 14:	Vpliv različnih koncentracij očiščene aktivne komponente gasericina K7 B (2,5 µg/mL, 5 µg/mL in 10 µg/mL) na TEER celic Caco-2.....	75
Slika 15:	Vpliv seva <i>L. gasseri</i> K7 (100 KE/Caco-2), dodanega celicam Caco-2 hkrati s PDB, na TEER.....	76
Slika 16:	Vpliv PDB na TEER po predhodnem 6 h tretiranju celic Caco-2 s sevom <i>L. gasseri</i> K7 v koncentraciji 100 KE/Caco-2	77
Slika 17:	Vpliv aktivne komponente gasericina K7 B (2,5 in 10 µg/mL) in PDB istočasno na TEER monosloja celične kulture Caco-2.....	78

Slika 18:	TEER celic Caco-2, nasajenih na membrane in vzorčenih za analize s konfokalnim mikroskopiranjem	79
Slika 19:	TEER celic Caco-2, tretiranih s PDB in PDB ter <i>L. gasseri</i> K7 istočasno ter vzorčenih po 3 h inkubacije za pripravo preparatov za analiziranje s konfokalnim mikroskopiranjem	80
Slika 20:	Razporeditev proteinov tesnih stikov – okcludina	81
Slika 21:	Razporeditev proteinov tesnih stikov - ZO-1	82
Slika 22:	Koncentracija IL-8 v gojišču, odvzetem na apikalni (AP) in bazolateralni (BL) strani monosloja celic Caco-2	84
Slika 23:	Koncentracija IL-8 (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) in TNF- α (D) (pg/mL), izmerjena v supernatantih gojišča celične linije THP-1 po 6 h stimulaciji	87

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AK	aminokislina
ATCC	ameriška zbirka tipskih kultur (angl. American Type Culture Collection)
AU	enote protimikrobne aktivnosti (angl. antimicrobial activity units)
BHI	angl. Brain Heart Infusion
BSA	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
DMEM	rastni medij za celice Caco-2 (angl. Dulbecco's modified Eagle's medium)
EDTA	etilen diamin tetraocetna kislina (angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
FBS	serum govejega zarodka (angl. fetal bovine serum)
FPLC	tekočinska kromatografija za hitro ločevanje beljakovin (angl. fast protein liquid chromatography)
G-CSF	faktor, ki spodbuja razvoj granulocitnih kolonij (angl. granulocyte colony stimulating factor)
HEPES	Hanksova solna raztopina
HPK	histidin peptidna kinaza (angl.: histidine peptidase kinase)
IFN	interferon
IL	interlevkin
KE	število kolonijskih enot
KE/Caco-2	število kolonijskih enot na 1 celico Caco-2
K7	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7
L.	<i>Lactobacillus</i>
LPS	lipopolisaharidi
LTA	lipoteihojska kislina
MKB	mlečnokislinske bakterije
MRS	gojišče De Man, Rogosa, Sharp za laktobacile
NCDO	Nacionalna zbirka mlekarskih organizmov, Reading, Anglija (National Collection of Dairy organisms, Reading, England)
NF-κB	transkripcijski faktor kapa B (angl.: nuclear factor kappa B)

PAMPs	molekulski vzorci patogenih mikroorganizmov (angl. pathogen associated molecular patterns)
PBMC	mononuklearne celice periferne krvi (angl. peripheral blood mononuclear cells)
PBS	fosfatni pufer (angl. phosphate buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PDB	forbol 12,13-dibutirat (angl. phorbol 12, 13-dibutyrate)
PMA	forbolni ester (angl. phorbol 12-myristate 13-acetate)
QS	regulacijski mehanizem, ki je odvisen od gostote bakterijske populacije (angl. quorum sensing)
RPMI	gojišče RPMI za celice THP-1 (angl. Roswell Park Memorial Institute growth medium for THP-1 cell line)
RP-HPLC	visokoločljiva tekočinska kromatografija z obrnjenimi fazami - (angl. reversed phase high performance liquid chromatography)
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elaktoforeza z natrijevim dodecil sulfatom (angl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
THP-1	človeška makrofagna celična linija
TLR	Toll-u podobni receptorji
TNF	dejavnik tumorske nekroze (angl. tumor necrosis factor)
2CRS	dvokomponentni regulatorni sistem pri bakterijah (angl. two-component regulatory system)

1 UVOD

1.1 UVOD IN HIPOTEZE

Proizvodnja bakteriocinov je pomemben dejavnik delovanja mikroorganizmov v okoljih, kjer poteka tekmovanje za preživetje. Ocenjujejo, da približno 99 % vseh bakterij in arhej proizvaja vsaj en bakteriocin. Raziskovanja so v zadnjem času usmerjena predvsem v raznolikost in ekološko vlogo bakteriocinov v kompleksnih mikrobnih združbah, kot je med drugimi tudi prebavni trakt.

Prebavni trakt človeka je kompleksen ekosistem, v katerem potekajo interakcije znotraj črevesne mikrobiote, kakor tudi med črevesno mikrobioto in epitelijskimi ter imunskimi celicami gostitelja (dendritske celice, makrofagi), ki imajo sposobnost odzivanja na mikrobne signale preko različnih receptorjev. Te interakcije so pomembne za vzdrževanje črevesne homeostaze in s tem povezane intaktne črevesne pregrade. Povečano izločanje vnetnih citokinov in apoptoza epitelijskih celic povzročita porušenje epitelijske integritete, ki pogosto vodi tudi v razvoj vnetnih črevesnih bolezni. Prebavni trakt je razdeljen na predele z različnimi fizikalno-kemijskimi razmerami, ki vplivajo na mikrobioto. Rod *Lactobacillus* (*L.*) je običajno prisoten v črevesni mikrobioti. Tudi med probiotiki, ki so pomembna sestavina številnih probiotičnih živil in prehranskih dopolnil, najdemo številne seve laktobacilov. Po zaužitju se probiotične bakterije srečajo s številnimi obrambnimi dejavniki v prebavilih, kot so želodčna kislina oziroma nizek pH v želodcu, žolčne soli, ki se izločajo v luminalno vsebino v proksimalnem delu tankega črevesa, encimi in mucini. V črevesu se srečajo tudi z ostalimi črevesnimi mikroorganizmi, t.i. mikrobioto, s katerimi tekmujejo za vezavo na epitelijske celice črevesne sluznice in na črevesno sluz (mukus) ali jih neposredno zavirajo z različnimi metaboliti, med katerimi so tudi bakteriocini. Med mehanizmi vplivanja probiotikov na črevesno mikrobioto in na gostitelja veljajo za najpomembnejše vplivanje na imunski sistem, kompetitivno izključevanje, inhibicija pripenjanja na črevesno sluznico in neposredno zaviranje drugih bakterij z metaboliti, med katerimi so pomembni tudi bakteriocini.

Za predstavnike različnih vrst rodu *Lactobacillus* je bilo dokazano, da izločajo bakteriocine *in vitro* in *in vivo*. Medtem ko so posredno vlogo bakteriocinov

laktobacilov pri zaščiti pred okužbami, preko zaviranja črevesnih patogenov, že veliko raziskovali, pa vloga bakteriocinov kot signalnih molekul v interakcijah z drugimi bakterijami v črevesnih biofilmih ali v interakciji z gostiteljevim imunskim sistemom ostaja velik izziv. Na možnost tvorbe bakteriocinov v prebavilih kažejo rezultati nekaterih raziskav, v katerih so *in vitro* v razmerah, podobnih tistim v prebavnem traktu, zaznali izražanje genov, povezanih z biosintezo in izločanjem bakteriocinov. Novejše raziskave so pokazale, da so tudi bakteriocini probiotičnih bakterij, ne le same bakterijske celice, sposobni neposredno vplivati na celice črevesne sluznice gostitelja ter tako pozitivno vplivati na črevesno barierno funkcijo in na imunski odziv gostitelja. Zato je sposobnost proizvodnje bakteriocinov pomembna lastnost seva v postopku izbora probiotikov.

Lactobacillus gasseri K7 je sev, izoliran iz blata dojenčka. Zaradi protimikrobne aktivnosti je postal zanimiv kot potencialni probiotični mikroorganizem. Njegove probiotične lastnosti so bile testirane *in vitro* ter *in vivo*. Dosedanje raziskave bakteriocinov seva *L. gasseri* K7 so se osredotočale na genetsko karakterizacijo gasericinov K7. Glavni cilj raziskave, predstavljene v doktorski disertaciji, pa je bil izolirati protimikrobne peptide gasericinov seva K7 ter ugotoviti protimikrobno aktivnost posameznih aktivnih komponent kompleksa gasericinov K7. Prav tako je bil naš namen razviti izolacijski protokol, po katerem bi dobili takšne količine bakteriocinov, ki bi zadostovale za nadaljnje raziskave njihovega delovanja tudi *in vitro* na celičnih modelih.

1.2 HIPOTEZE

- ❖ Probiotični sev *Lactobacillus gasseri* K7 proizvaja bakteriocine (gasericin K7 A in gasericin K7 B) tudi v simuliranih razmerah prebavnega trakta.
- ❖ Sev *Lactobacillus gasseri* K7 in njegovi bakteriocini vplivajo na črevesne epiteljske celice. Možno je:
 - povečano izražanje genov za proteine tesnih stikov
 - povečana transepiteljska električna upornost (TEER – iz angl.: transepithelial electrical resistance).
- ❖ Probiotični sev *Lactobacillus gasseri* K7 in njegovi bakteriocini vplivajo na epiteljske in/ali imunske celice tudi imunomodulatorno.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PREBAVNI TRAKT KOT EKOSISTEM

Prebavni trakt človeka je prebivališče številnih mikroorganizmov. Med njimi so najbolj dominantni predstavniki iz debel *Firmicutes*, *Bacteroides* in *Actinobacteria*. Zelo kompleksna skupnost, imenovana mikrobiota, je funkcionalno stabilna vendar dinamična glede na sestavo (Lebeer in sod., 2008; Marzorati in sod., 2011).

Prebavni trakt je kompleksen ekosistem, kjer je prisotna velika raznolikost mikroorganizmov in velika gostota celic, zaradi česar pride do različnih interakcij med mikroorganizmi ter mikroorganizmi in gostiteljem. Komunikacija poteka preko zunajceličnih signalnih molekul, ki imajo vlogo koordinacije različnih prilagoditvenih procesov v skupini celic, kot so tekmovanje za hranila in vezava na črevesne celice (Gillor in sod., 2008; Lebeer in sod., 2008). Mikroorganizmi tekmujejo za omejeni prostor in hranila v ekoloških nišah, zato so razvili številne strategije za preživetje, med katerimi je tudi proizvodnja protimikrobnih snovi (Gillor in sod., 2008). Struktura in sestava takšnega ekosistema kaže na naravno selekcijo na nivoju mikrobne združbe in gostitelja z namenom razviti obojestransko sodelovanje, ki teži k funkcionalni stabilnosti oz. simbiozi (Marzorati in sod., 2011).

2.1.1 Anatomska razdelitev ter spreminjanje fizikalno-kemijskih razmer v prebavnem traktu človeka

Prebavni trakt človeka je sestavljen iz anatomske različnih predelov. V grobem ga razdelimo na želodec in črevesje. Črevesje je organ, v katerem se odvijajo kompleksne interakcije med hrano, mikrobi in celicami gostiteljevega epitelija. Sestavljata ga dve anatomske regiji: tanko črevo, ki se deli na dvanajstnik (angl. duodenum), tešče (angl. jejunum) in vito črevo (angl. ileum), in debelo črevo, ki ga anatomske razdelimo na kolon, slepo črevo (angl. caecum) in rektum, ki se nadaljuje v anus in predstavlja končni del prebavnega trakta (Remus in sod., 2011). V različnih predelih so tudi fizikalno-kemijske razmere raznolike. V želodec se pri človeku izloči dnevno približno 2,5 litra želodčnega soka s pH 1,5, kadar je želodec prazen. Ko vanj prispe hrana, se vrednost pH zviša na 2-5. Jetra izločijo približno 1 liter žolča dnevno v tanko črevo. Žolčne soli

nastanejo z oksidacijo holesterola in konjugacijo z glicinom ali taurinom. Imajo pomembno vlogo pri prebavi maščob in absorpciji vitaminov, ki so topni v maščobah. Koncentracija žolčnih soli v tankem črevesu se giblje od 0,2 do 2 %, odvisno od vsebnosti privzetih maščob iz hrane (Whitehead in sod., 2008). V želodcu je ekstremno nizek pH, medtem ko je v dvanajstniku in tankem črevesu prisotna visoka koncentracija žolčnih soli. Takšne razmere vplivajo tako na gostoto kot tudi na sestavo mikrobne združbe vzdolž prebavnega trakta (Lebeer in sod., 2008; Remus in sod., 2011).

2.1.2 Spreminjanje številčnosti in sestave mikrobiote vzdolž prebavnega trakta

Dejavniki, ki vplivajo na sestavo črevesne mikrobiote, se delijo na tiste, povezane z gostiteljem (pH, prehodni čas, žolčne soli, encimi trebušne slinavke in sestava mukusa), na od gostitelja neodvisne (hranila, zdravila in okoljski dejavniki) ter na tiste, povezane z mikroorganizmi (sposobnost adhezije, izločeni encimi ter metabolizem) (Penders in sod., 2007).

Črevo zarodka je v manjši meri poseljeno z mikroorganizmi. Po porodu se začne intenzivno naseljevanje prebavnega trakta s številnimi mikroorganizmi kot so *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp. in *Bifidobacterium* spp. Ta združba bakterij, ki naseljuje črevo, se imenuje komezalna črevesna mikrobiota (Aagaard in sod., 2014).

Pri odraslem človeku se med mikroorganizmi in epitelijskimi celicami vzdržuje simbiotski odnos, ki pomembno prispeva k delovanju prebavnega trakta. Določeni fiziološki procesi gostitelja so odvisni od interakcij s to skupnostjo, imenovano mikrobiota. Prisotnost posameznih debel, rodov in vrst se spreminja glede na razvoj gostitelja, način prehranjevanja in lokacijo v prebavnem traktu. Koncentracija bakterij se spreminja od 10^3 KE/mL vsebine v želodcu, kjer je število bakterij majhno zaradi delovanja želodčne kisline, do $10^{11} - 10^{12}$ KE/g vsebine v debelem črevesu. Nizek pH v želodcu, žolčne soli, hiter prehod hrane, izločanje protimikrobnih peptidov ter proteolitičnih encimov v tankem črevesu zavirajo preživetje večine mikroorganizmov v teh delih prebavil (Ridlon in sod., 2006). Čeprav je v želodcu in prvih dveh tretjinah ozkega črevesja vsebnost hranilnih snovi največja, je zaradi nizke vrednosti pH v želodčni vsebini (pH 2), toksičnosti žolčnih soli in relativno hitrega prehoda črevesne

vsebine, v teh delih človekovega črevesja prisotnih le malo mikroorganizmov. V želodcu in začetnem delu tankega črevesa (duodenum, jejunum) prevladujejo predvsem aerobni in mikroaerofilni mikroorganizmi, npr. vrste rodov *Streptococcus*, *Candida albicans* in *Helicobacter pylori*, najdemo pa tudi predstavnike rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*. Prebava tu poteka pretežno z endogenimi izločki prebavil, delno pa tudi s fermentacijo, katere glavni produkt je mlečna kislina. Proti koncu tankega črevesa (ileum) se število mikroorganizmov poveča, prevladovati začnejo fakultativni anaerobni in anaerobni mikroorganizmi: *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides* spp., *Veillonella* spp. in *Clostridium* spp. Največ mikroorganizmov, tako številčno kot po raznolikosti vrst, naseljuje debelo črevo, kjer se prebavna vsebina zadržuje dlje časa in je pH relativno visok. V mikrobioti debelega črevesa so dominantni obligatorni anaerobi, kot so *Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp., *Clostridium* spp., *Bifidobacterium* spp. *Fusobacterium* spp., *Ruminococcus* spp.. Fakultativnih anaerobov iz rodov *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* ter družine *Enterobacteriaceae* je manj (Ridlon in sod., 2006; Penders in sod., 2007).

Bakterije vzdolž gastrointestinalnega trakta so lahko prostoživeče v črevesni svetlini ali pa pritrjene na mukus, na površino enterocitov ali na delce hrane. Vezane bakterije tvorijo mikrokolonije, kar vodi k nastanku biofilmov, ki se razvijejo v kompleksno skupnost, sestavljeno iz različnih bakterijskih vrst (Penders in sod., 2007).

2.1.2.1 Oblikovanje biofilma

Zelo malo je znanega o strukturi in funkciji mikrobnih biofilmov v človeškem prebavnem traktu (Marzorati in sod., 2011). Veliko mikroorganizmov v prebavnem traktu se veže na epitelijski sloj, kar je prvi korak k tvorbi biofilma. Biofilmi so agregati na površino vezanih mikroorganizmov, obdani z matriksom. Sestavljeni so iz mešanih mikrobnih kultur, ki se s številnimi morfološkimi in fiziološkimi prilagoditvami odzivajo na spreminjajoče se okolje.

Različni gradienti snovi, hranil in kisika oblikujejo znotraj biofilma mikrookolja, na katera se morajo mikroorganizmi prilagoditi, da preživijo. Posebna lastnost mukoznega biofilma je prisotnost mikroaerofilnih razmer na bazalni strani, zaradi difuzije kisika od krvnega obtoka gostitelja proti epiteliju, in anaerobnih razmer na apikalni strani. Drugi

ključni dejavnik je prisotnost različnih koncentracij raznih snovi in tekočin, ki prehajajo iz svetline skozi sloj epitelija, kar dodatno vpliva na oblikovanje in debelino biofilma (Marzorati in sod., 2011).

Pri odraslem človeku je večina bakterijskih vrst v biofilmu anaerobnih, prisotnih pa je tudi nekaj aerobnih in fakultativnih vrst (Gillor in sod., 2008). Sposobnost vezave na sloj mukusa je značilna za večino vrst *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Spirochaetes*, *Lactobacillus* in *Fusobacterium*. Slednji imajo pomembno vlogo pri zgodnjem naseljevanju mukoznega sloja. Iz ekološkega vidika je življenje v biofilmu prednost, ki omogoča mikroorganizmom življenje v zaščiteni niši, direktno interakcijo z gostiteljem in daljšim rokom preživetja v prebavilih ter večji metabolni izkoristek (Marzorati in sod., 2011).

V vzpostavljenih biofilmih so bakteriocini molekule, ki so pomembne za medcelično komunikacijo (Gillor in sod., 2008).

2.1.2.2 Interakcije med gostiteljem in mikrobioto

Med gostiteljem in mikrobioto obstajajo različne vrste interakcij. Komenzalne bakterije preko adhezije stopajo v neposredni kontakt z gostiteljem in pozitivno vplivajo na aktivacijo naravne in pridobljene imunosti. V zameno imajo bakterije možnost bivanja v črevesu daljše časovno obdobje in vplivanja na fiziologijo gostitelja. Poleg pravih komenzalov je prebavni trakt gostitelj številnih oportunistov, ki jih najdemo večinoma v suspenziji v črevesni svetlini. Mikroorganizmi dobijo v zameno možnost življenja v okolju z veliko prostimi hranili (Marzorati in sod., 2011).

Kljub temu, da so nekatere bakterije potencialno patogene in lahko postanejo vir okužb in sepse, so interakcije med bakterijami in gostiteljem večinoma simbiotične. Med najpomembnejšimi mehanizmi ugodnega delovanja mikrobiote je kolonizacijska rezistenca. S tekmovanjem za hranila, vezavo na mukus ter proizvodnjo protibakterijskih snovi (tudi bakteriocinov) črevesna mikrobiota oteži naseljevanje patogenih mikroorganizmov in zmanjšuje njihovo gostoto. Mikroorganizmi črevesne mikrobiote nudijo gostitelju še veliko drugih pozitivnih učinkov: razgrajujejo hrano, fermentirajo neprebavljene ostanke hrane, spodbujajo imunski sistem, proizvajajo

protimikrobne snovi (kisline, vodikov peroksid, bakteriocine), proizvajajo vitamine (vitamini B ter K) in vplivajo na metabolizem holesterola. Nekatere bakterije so vključene v metabolizem potencialnih kancerogenih snovi ali pozitivno vplivajo na učinek določenih zdravil. Predvsem v debelem črevesu mikroorganizmi črevesne mikrobiote fermentirajo ogljikove hidrate v kratkoverižne maščobne kisline, ki so pomemben vir energije za epiteljske celice črevesa in olajšajo absorpcijo tekočine ter natrijevih ionov. Mikroba razgradnja dušikovih snovi v amoniak je pomembna za sintezo nekaterih aminokislin in za sproščanje prebavnih encimov v črevesno svetlino. Porušen odnos med epiteljskimi celicami črevesa in mikrobioto lahko vodi do vnetja, do poškodb tkiva in do različnih bolezni ter okužb s patogenimi mikroorganizmi (Marzorati in sod., 2011; Neish in sod., 2002; Penders in sod., 2007; Remus in sod., 2011).

Raziskovanje interakcij med gostiteljem in mikrobioto *in vivo* je omejeno zaradi omejene dostopnosti do vzorcev iz prebavnega sistema. Vendar je tudi s pomočjo metod *in vitro*, ki omogočajo simulacijo epiteljskega okolja v črevesju, mogoče priti do ugotovitev, ki pripomorejo k razumevanju interakcij *in vivo* (Marzorati in sod., 2011).

2.1.3 Rod *Lactobacillus*

V črevesni mikrobioti pogosto najdemo bakterije rodu *Lactobacillus*. Pri odraslem človeku prevladujejo *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. crispatus*, *L. salivarius* in *L. ruminis*. Najdemo pa tudi *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. curvatus* in *L. sakei* (Leeber in sod., 2008). Pri otrocih so večinoma prisotne naslednje vrste: *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* (Wells, 2011) ter *L. gasseri* (Selle in Klaenhammer, 2013).

2.1.3.1 Probiotični laktobacili

Probiotične bakterije lahko izkazujejo številne pozitivne učinke na zdravje gostitelja: ščitijo pred infekcijami, zmanjšajo pogostost pojavljanja diareje ali skrajšajo trajanje, zmanjšajo pojavnost prehladov in grip, zmanjšajo koncentracijo biomarkerjev povezanih s kolorektalnim rakom, vzpostavljajo ravnovesje mikrobiote po zdravljenju z antibiotiki, povečajo celično imunost, povečajo humoralni odziv (IgA), znižajo

holesterol v krvi ter zmanjšajo simptome sindroma razdražljivega črevesja (IBS – iz angl.: irritable bowel syndrome; Diep in sod., 2009). Laktobacili so že dolgo časa poznani v povezavi s fermentacijo hrane v živilski industriji (Wells, 2011). Tudi večina najbolj proučenih probiotikov spada v rod *Lactobacillus*. Ti mikroorganizmi so namreč izolirani večinoma iz prebavnega trakta, kjer so del naravne mikrobiote ter so v splošnem odporni proti žolčnim solem in kislinam (Remus in sod., 2011; Wells, 2011; O'Flaherty in sod., 2012).

Obstajata 2 glavni kategoriji dejavnikov, ki prispevajo k optimalnemu delovanju probiotičnih laktobacilov. Eni omogočajo optimalno adaptacijo na nove ekološke niše in se imenujejo adaptacijski dejavniki. Druga skupina so dejavniki, ki neposredno učinkujejo na zdravje in se imenujejo probiotični dejavniki. Probiotični dejavniki obsegajo 3 glavne mehanizme probiotičnega delovanja: vzdrževanje mikrobnega ravnotežja, zaščito epitelija ter imunomodulacijo. Adaptacijski dejavniki, kot so odpornost proti različnim ekstremnim razmeram v prebavnem traktu, aktivna adaptacija metabolizma na okolje gostitelja ter vezava na črevesno mukozo, sicer prispevajo k probiotičnemu učinkovanju, vendar nimajo neposrednih učinkov na zdravje (Leeber in sod., 2008).

Probiotični laktobacili se med prehodom skozi prebavni trakt srečajo z različnimi razmerami. Najprej morajo preživeti nizek pH, ki je prisoten v želodcu. Mehanizem odziva na kislino okolje ter učinek na fiziologijo bakterijske celice ni popolnoma znan. Z nižanjem znotrajceličnega pH se zmanjša transmembranska razlika v vrednostih pH, kar pomeni zmanjšanje protonske gibalne sile, ki je vir energije v številnih transmembranskih transportnih procesih. Znižanje pH zmanjša aktivnost za kislino občutljivih encimov, kar vodi v poškodbo proteinov in DNA. Prav tako ni natančno raziskan učinek žolčnih kislin na bakterijsko celico. Žolčne soli so površinsko aktivne, amfipatične molekule s protimikrobno aktivnostjo, ki zrušijo biološke membrane. Prav tako pa naj bi žolčne soli povzročile znotrajcelično zakisanje, tako da so obrambni mehanizmi skupni tako za žolčni kot tudi kislini stres (Leeber in sod., 2008).

Pomemben del probiotičnega delovanja je sposobnost probiotikov, da vplivajo na gostiteljev organizem preko direktnega delovanja na mikrobioto. Do sedaj je bolj

proučeno delovanje probiotikov proti patogenom preko tekmovanja za hranila, proizvodnje protimikrobnih snovi, kompetitivnega izključevanja, imunomodulacije preko aktivacije imunskih celic in okrepitve epitelijske pregrade s pomočjo povečanega izražanja proteinov tesnih stikov. V zadnjem času je veliko raziskav usmerjenih tudi v proučevanje protimikrobnih molekul iz skupine bakteriocinov. Za predstavnike večine vrst rodu *Lactobacillus* je bilo dokazano *in vitro* in *in vivo*, da izločajo bakteriocine (Gillor in sod., 2008; Corr in sod., 2009).

2.1.3.2 Vrsta *Lactobacillus gasseri*

Lactobacillus gasseri je razširjena komenzalna vrsta, ki naseljuje človeške mukozne niše, kot so nožnica, ustna votlina in prebavni trakt. Odkritje celotnega genoma seva *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 je razkrilo tudi osnove mehanizma za preživetje prehoda skozi prebavni trakt. Analize številnih sevov *Lactobacillus gasseri* za preživetje v simuliranem želodčnem soku so pokazale, da je preživetje odvisno od seva, vendar je vrsta *L. gasseri* v splošnem tolerantna proti kislini in žolču. *L. gasseri* ATCC 33323 ima zapis za določene proteazne šaperone, ki ščitijo celice proti znotrajcelični agregaciji proteinov med izpostavitvijo stresu. Prav tako pa ima ta vrsta hidrolazo žolčnih soli, homologno specifični hidrolazi, ki razgrajuje žolčne soli, konjugirane s taurinom ter operon, podoben operonu vrste *L. acidophilus*, ki prispeva k toleranci proti žolču (Selle in Klaenhammer, 2013).

Vrsto *L. gasseri* so na podlagi hibridizacije DNA klasificirali kot skupino B kompleksa *L. acidophilus*. Od predstavnikov skupine A se razlikuje tudi po odsotnosti zunanega sloja proteinov na površini celic (S-layer). Vrsto *L. gasseri* pogosto najdemo pri otrocih že v obdobju zgodnjega poseljevanja prebavil, prav tako pa je prisotna v odrasli dobi. Pogosto naseljuje mukozne niše, kar kaže na razširjenost te komenzalne vrste pri zdravih posameznikih. *L. gasseri* SBT 2055, ki proizvaja bakteriocine, so izolirali iz blata odraslega človeka (Kawai in sod., 2000, 2006). Nekatere dobro raziskane seve te vrste, kot so *L. gasseri* LA158 (Kawai in sod., 2000, 2006), *L. gasseri* LF221 (Matijašič in sod., 2004; Rogelj in Matijašič, 2006; Stojković, 2003) ter *L. gasseri* K7 (Matijašič in Rogelj, 2000; Rogelj in Matijašič, 2006), pa so izolirali iz blata otrok. *L. gasseri* K7 je izolat iz blata dojenega otroka s probiotičnimi lastnostmi, ki so jih raziskali v *in vitro* in

in vivo študijah (Majhenič in sod., 2003, 2004; Matijašič in sod., 1998, 1999, 2003; Matijašič in sod., 2004, 2006; Rogelj in Matijašič, 2006; Sagaya in sod., 2013). Tudi drugi sevi vrste *L. gasseri* so znani po proizvodnji bakteriocinov (Selle in Klaenhammer, 2013).

2.2 BAKTERIOCINI RODU *Lactobacillus*

Črevesna mikrobiota je bogat vir potencialnih probiotičnih bakterij, ki proizvajajo protimikrobne snovi. V zadnjih letih je poudarek na raziskovanju bakteriocinov kot dejavnikov probiotičnega delovanja (O'Shea in sod., 2012). Bakteriocini so raznolika skupina ribosomsko sintetiziranih peptidov, ki izražajo protimikrobno aktivnost proti mikroorganizmom iste vrste (ozek spekter delovanja) ali mikroorganizmom drugih vrst in/ali rodov (širok spekter delovanja) (Gillor in sod., 2008). Izločajo jih tako po Gramu negativne kot po Gramu pozitivne bakterije.

Prvi dobro proučeni bakteriocini so bili kolicini, izolirani iz kultur vrste *Escherichia coli*. Služijo kot modelni sistem za preučevanje mehanizmov bakteriocinske strukture, funkcije, genetske organizacije, ekologije in evolucije. So proteini z visoko molekularno maso in zapisom na plazmidu. Inducirani so pod vplivom stresa. Opisali so čez 30 vrst kolicinov (Gillor in sod., 2008; Majeed in sod., 2011).

Za večino vrst rodu *Lactobacillus* je bilo dokazano, da proizvajajo bakteriocine *in vitro* in *in vivo* (Gillor in sod., 2008). Večina bakteriocinov vrst rodu *Lactobacillus* spada v razred II (Zhu in sod., 2000). Bakteriocini razreda II so majhni peptidi (< 10 kDa), ki ne vsebujejo lantionina in nimajo post-translacijskih modifikacij (Gillor in sod., 2008).

2.2.1 Uvrstitev bakteriocinov rodu *Lactobacillus* v klasifikacijsko shemo

Rod *Lactobacillus* uvrščamo v skupino mlečnokislinskih bakterij. Bakteriocini mlečnokislinskih bakterij so velika in raznolika skupina peptidov, ki se med sabo razlikujejo po mestu nahajanja genskega zapisa (plazmid, kromosom), molekularni masi, biokemijskih lastnostih, strukturi, protimikrobnemu spektru in načinu delovanja. Tradicionalno so bili razvrščeni v razrede na podlagi naštetih lastnosti (Klaenhammer, 1988). Kljub novejšim pristopom h klasifikaciji bakteriocinov, ki upoštevajo strukturne

podobnosti med bakteriocini in filogenetsko sorodnost, se še vedno največ uporablja klasifikacija po Klaenhammer-ju (1988).

Klaenhammer (1988) je razdelil bakteriocine mlečnokislinskih bakterij v štiri razrede:

- Razred I – post-translacijsko modificirani bakteriocini, lantibiotiki (nizin)
- Razred II – majhni (<10 kDa) termostabilni, membransko aktivni bakteriocini, razdeljeni v podrazrede:
 - IIa – protilisterijski peptidi z aminokislinskim motivom YGNGV/L na N-terminalnem delu peptida
 - IIb – dvokomponentni peptidi
 - IIc – s tiolom aktivirani peptidi, ki potrebujejo za aktivnost reducirane cisteinske ostanke
- Razred III – večji (> 30 kDa) bakteriocini
- Razred IV – kompleksni bakteriocini.

Raznolikost bakteriocinov mlečnokislinskih bakterij in njihov širok spekter delovanja odseva sposobnost preživetja in delovanja te skupine bakterij v različnih habitatih, od fermentirane hrane do prebavnega trakta sesalcev (Allison in sod., 1994). Bakteriocini proučevanega seva *Lactobacillus gasseri* K7 spadajo v podrazred IIb.

2.2.2 Organizacija genov za bakteriocine razreda II

Geni za bakteriocine ležijo na plazmidu ali na kromosomu (Gillor in sod., 2008). Strukturni geni nosijo zapis za prebakteriocin, ki se imenuje tudi prekursor ali prepetid. Pri dvopeptidnih bakteriocinih si sledita dva strukturna gena eden za drugim (Eijsink in sod., 2002; Todorov in Dicks, 2006). Poleg strukturnih genov so za tvorbo bakteriocinov potrebne še genske determinante, ki so vpletene v imunost in transport/izločanje bakteriocina (ABC-transporter in akcesorni peptid). Geni za imunost, ki zagotavljajo zaščito organizma pred lastnimi bakteriocini, se nahajajo neposredno za strukturnimi geni.

Za nekatere druge bakteriocine, kot so na primer plantaricin E/F in plantaricin J/K, geni za ABC transporter in akcesorni peptid ležijo na ločenem operonu blizu operona z geni za aktivni in komplementarni peptid ter protein imunosti (Nissen-Meyer in sod., 2010). Bakteriocini z dvoglicinskim N-terminalnim vodilnim zaporedjem se izločajo iz celice z aktivnim transportom, vezanim na energijo ATP, ki ga imenujemo ABC-transportni sistem. Pri transportu sodeluje transmembranski translokator, ki pripada družini ABC-transportnih proteinov, in dodatni transportni protein (Eijsink in sod., 2002). Vodilna sekvenca verjetno vzpodbudi interakcijo z ABC-transporterjem in ima vlogo pri zaščiti bakterijske celice, s tem da obdrži bakteriocin neaktiven, dokler se ne izloči (Nissen-Meyer in sod., 2010).

Bakteriocinogena bakterija se mora zaščititi pred delovanjem lastnega bakteriocina, tako da tvori protein imunosti. Pri večini nelantibiotikov najdemo en sam gen, ki kodira membransko lociran peptid, ki zagotavlja imunost. Peptidi imunosti so kationske molekule, velike med 50 in 250 aminokislin, za izločanje pa ne potrebujejo lastnega procesno-transportnega sistema. Zaenkrat še niso odkrili jasnega modela, kako naj bi peptidi imunosti varovali bakteriocinogene bakterije pred lastnimi bakteriocini. Verjetno je za zaščito potrebna interakcija z membrano (Nissen-Meyer in sod., 2010).

2.2.3 Regulacija biosinteze bakteriocinov razreda II

Mehanizmi za specifično zaznavanje prisotnosti določenih stresnih faktorjev in za regulacijo ekspresije genov, kot odgovora na dražljaje iz okolja, so ključni za preživetje bakterij v različnih razmerah. Pri rodu *Lactobacillus* odzivanje na stresne okoliščine vključuje dvokomponentni regulatorni sistem (2CRS - iz angl.: two-component regulatory system). Preko 2CRS bakterije zaznavajo spremembe v svojem okolju. Po sprejetju signala iz okolja se temu primerno odzovejo. Dvokomponentni regulatorni sistem vključuje:

- membransko vezane histidinske proteinske kinaze (HPK – iz angl.: histidine peptide kinase)
- znotrajcelični odzivni regulator (RR – iz angl.: response regulator) – po fosforilaciji s HPK se ta specifično veže na regulatorne promotorje

bakteriocinskih operonov in aktivira izražanje genov (Eijsink in sod., 2002; Leeber in sod., 2008).

Pri večini bakterij, ki tvorijo bakteriocine, je njihova tvorba vezana na fazo rasti, v kateri se nahajajo celice. Pogosto je tvorba bakteriocinov omejena na srednjo ali pozno eksponencialno fazo, do začetka stacionarne faze rasti (Gillor in sod., 2008). Nekatere dvopeptidne bakteriocine bakterije proizvajajo konstantno, medtem ko je proizvodnja ostalih dvopeptidnih bakteriocinov, kot so plantaricin E/F, plantaricin J/K, ABP-118 in NC8, transkripcijsko regulirana preko trikomponentnega regulatornega sistema (QS 2CRS), ki ga sestavljajo poleg 2CRS še peptid, ki deluje kot feromon (indukcijski faktor). Takšen mehanizem so poimenovali »quorum sensing« (Nissen-Meyer in sod., 2010; Eijsink in sod., 2002).

2.2.3.1 »Quorum sensing«

»Quorum sensing« je regulacijski mehanizem, ki je odvisen od gostote bakterijske populacije in omogoča populaciji, da deluje na koordiniran način (Risoen in sod., 2000). »Quorum sensing« omogoča populaciji bakterij, da regulira izražanje genov in sinhronizira vedenje skupine. Pri po Gramu negativnih bakterijah so signalne molekule acetil homoserin laktoni, pri po Gramu pozitivnih bakterijah pa peptidi. »Quorum sensing« omogoča bakterijam dostop do hranil ali okoljskih niš, omogoča pa jim tudi, da razvijejo obrambno sposobnost proti kompetitivnim mikroorganizmom ter optimizira sposobnost celice, da se diferencira v morfološko obliko, ki je boljše prilagojena okolju v gostitelju. Bakterije uporabljajo sistem »quorum sensing« za regulacijo nekaterih fizioloških procesov kot so integracija tuje DNA, regulacija virulence in oblikovanje biofilmov (Gillor in sod., 2008). Pri po Gramu pozitivnih bakterijah je bila regulacija quorum sensing dokazana in raziskana med drugimi tudi za proizvodnjo protimikrobnih peptidov, vključno s proizvodnjo nekaterih bakteriocinov vrst rodu *Lactobacillus* (Hauge in sod., 1998).

Bakterijska komunikacija pri po Gramu pozitivnih bakterijah v splošnem poteka preko specifičnih avtoinduktorskih peptidov, ki so pogosto posttranslacijsko modificirani in se izločajo preko specifičnega transportnega sistema. Te signale prepoznajo celice preko

2CRS. S pomočjo analiz *in silico* so prepoznali pet QS 2CRS pri *L. plantarum* WCFS1, po dva pri *L. acidophilus* NCFM in *L. johnsonii* NCC533, po enega pri *L. salivarius* UCC118 in *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* ATCC BAA-365 ter nobenega pri *L. gasseri* ATCC 33323. Veliko število takih proteinov pri *L. plantarum* WCFS1 kaže na ekološko fleksibilnost. Ta sev namreč lahko najdemo na rastlinah, v fermentirani hrani in tudi v prebavnem traktu. Ostale vrste laktobacilov so glede na nižjo število QS 2CRS bolj omejene na specifična okolja (Leeber in sod., 2008).

2.2.4 Mehanizem delovanja bakteriocinov razreda II

Bakteriocini razreda II so baktericidni peptidi, ki tvorijo pore v membrani tarčne celice, kar povzroči ionsko neravnovesje, uhajanje metabolitov in anorganskih fosfatov iz celice. Posledica je izguba protonskega gradienta, zaradi česar se izgublja transmembranski potencial in/ali pH gradient, kar vodi v celično smrt (Gillor in sod., 2008; Nissen-Meyer in sod., 2010).

Študije strukture in funkcije so dokazale, da dvopeptidni bakteriocini tvorijo helikalne strukture s posebnimi motivi (GxxxG), ki penetrirajo skozi membrano. Domnevajo, da helikalna struktura vpliva na integriran membranski protein in s tem povzroči konformacijske spremembe proteina, kar vodi v prepustnost membrane za majhne molekule. Dvopeptidni bakteriocini, kot sta plantaricin E/F in plantaricin J/K, naredita membrano prepustno za monovalentne ione, vključno s H^+ , vendar ne za divalentne ione (Mg^{2+}) ali anione (fosfat) (Nissen-Meyer in sod., 2010).

Mehanizem prepoznavanja tarčnih celic za razred IIb bakteriocinov še ni poznan. Receptorska molekula za razred bakteriocinov IIa, manozni-PTS transporter, ni občutljiva za plantaricin EF. Zaradi tega so prišli do sklepa, da razreda bakteriocinov IIa in IIb uporabljata različne mehanizme pri prepoznavanju tarčnih celic (Diep in sod., 2009).

2.2.5 Značilnosti bakteriocinov razreda IIb

Dvopeptidni bakteriocini so sestavljeni iz dveh različnih peptidov, katerih geni ležijo eden zraven drugega na istem operonu. Dvopeptidni bakteriocini so sintetizirani kot

prepeptidi, ki vsebujejo 15-30 aminokislinskih ostankov N-terminalne sekvence, tako imenovanega dvojno glicinskega tipa, ki se odcepi od C-terminalnega dela z ABC-transporterjem, ki prenese bakteriocin preko membrane. Vodilna sekvenca olajša interakcijo z ABC-transporterjem in vzdržuje bakteriocin v neaktivni obliki, dokler se ta ne izloči, in hkrati ščiti proizvajalca bakteriocina pred lastnim aktivnim peptidom bakteriocina. Primeri najbolj proučenih dvokomponentnih bakteriocinov vrst rodu *Lactobacillus*, so plantaricini (*L. plantarum*; Diep in sod., 2009), gasericini (*L. gasseri*; Kawai in sod., 2000) ter Abp-118 (*L. salivarius*; Corr in sod., 2007).

2.2.5.1 Bakteriocini družine laktacin F

Sevi skupine *Lactobacillus acidophilus*, v katero spada tudi vrsta *L. gasseri*, so naravni prebivalci človeškega prebavnega trakta ter znani kot proizvajalci bakteriocinov. Laktacin F, ki ga proizvaja *L. johnsonii* VPI1 1088 (NCC533), je glavni predstavnik bakteriocinov razreda IIb, ki imajo 2 peptida. V primeru laktacina F sta to peptida LafA in LafX. Znani so podatki o izolaciji zrelega aktivnega peptida LafA, kloniranju strukturnih genov (*lafA* in *lafX*) in molekularnih analizah operona *laf* (*lafAXI*) (Selle in Klaenhammer, 2013).

Tesno povezan z laktacinom F je gasericin T, ki ga proizvajata seva *L. gasseri* SBT 2055 ter *L. gasseri* LA158. Gasericin T je baktericidno aktiven proti predstavnikom vrst *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* in *Staphylococcus aureus*, ki so tudi pogosti patogeni v hrani (Kawai in sod., 2000). Peptid GatA gasericina T so očistili in analizirali z SDS-PAGE. Analiza je pokazala, da je njegova molekulska masa 5400 Da. Aminokislinsko zaporedje GatA ima 63 % podobnost s peptidom LafA laktacina F, GatX pa ima 60 % homolognost z LafX (**slika 1**; Kawai in sod., 2006).

	1	10	20	30	40	50	57
LafA	RNNWQTNVGG	AVGSAMIGAT	VGGTICGPAC	AVAGAHYLP	LWTGVTAATG	GFGKIRK	
GatA	RNNWAANIGG	VGGATVAGWA	LGNAVCGPAC	GFVGAHYVPI	AWAGVTAATG	GFGKIRK	
AmyL alfa	RNNWAGNTIG	IVSSAATGAA	LGSAICGPGC	GFVGAHWGAV	GWTAVASFSGA	FSGAFGKIRK	
	1	10	20	30	40	48	
LafX	NRWGDTVLSA	ASGAGT-	GIK ACKSFGP	- WGMAICGVGGA	AIGGYFGYTHN		
GatX	NKWGNAVIGA	ATGATR-GVSWCRG	FGP- WGMTACGLGG	AAIGGYLGYSN			
AmyL beta	NRWTNAYSAA	LGCAVP	GVKYGKKLGG	VWGAVIGGVG	GAAVCGLAGYVRKG		

Slika 1: Homolognost primarne strukture peptidov, predstavnikov bakteriocinov družine laktacina F (Kawai in Saito, 2011: 180)

Laktacin F (LafA, LafX), gasericin T (GatA, GatX) in amilovorin L (AmyL α , AmyL β)

Figure 1: Homology of the primary structure of bacteriocins that represent the lactacin F family of bacteriocins (Kawai and Saito, 2011: 180)

Lactacin F (LafA, LafX), gasericin T (GatA, GatX) in amilovorin L (AmyL α , AmyL β)

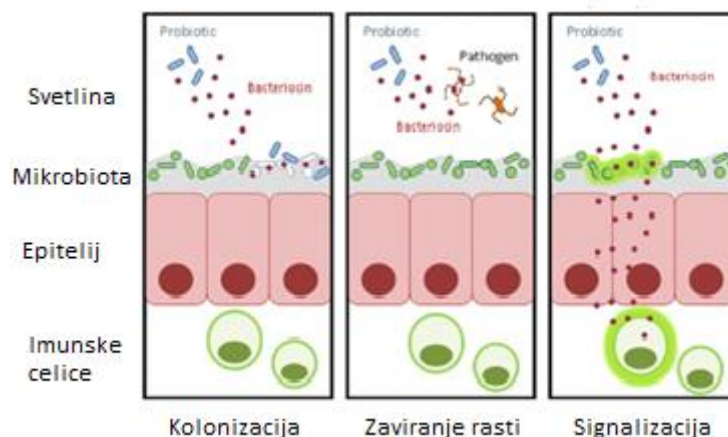
2.2.5.2 Bakteriocini vrste *Lactobacillus gasseri*

Veliko sevov vrste *Lactobacillus gasseri* naseljuje črevesje človeka ter proizvaja bakteriocine (Reuter in sod., 2001). Sev *Lactobacillus gasseri* LA39 proizvaja gasericin A. Le-ta je izjema med poznanimi gasericini, ker je edini ciklični bakteriocin s širokim spektrom delovanja. Iz kulture seva *Lactobacillus gasseri* JCM 2124 so izolirali 4 protimikrobne peptide (B1-B4). Delno sekvenciranje peptida B2 ni pokazalo podobnosti z nobenim od ostalih bakteriocinov. B1 in B3 imata primarno strukturo, podobno peptidoma dvokomponentnega bakteriocina acidocina J1132, izoliranega iz kulture *Lactobacillus acidophilus* J1132 (Tahara in sod., 1997). Zhu in sod. (2000) so izolirali in delno okarakterizirali gasericin KT7, ki ga proizvaja *Lactobacillus gasseri* KT7. Seva *L. gasseri* SBT2055 in LA158 proizvajata širokospektralni dvokomponentni bakteriocin gasericin T, sestavljen iz aktivne komponente GatA in komplementarne komponente GatX.

Bakteriocine seva *L. gasseri* K7 so proučevali na genomskem nivoju v predhodnih raziskavah, vendar jih še niso izolirali. Genetska karakterizacija je razkrila 2 genska sklopa, ki nosita zapis za 2 dvokomponentna bakteriocina, ki so jih poimenovali gasericin K7 A (GenBank EF392861) in gasericin K7 B (GenBank AY307382). Nukleotidna zaporedja genov za gasericina K7 A in K7 B so zelo podobna zaporedjem acidocinov LF221 A in LF221 B, ki so bili opisani pri sevu *L. gasseri* LF221 (prvotno *L. acidophilus* LF221, pozneje preklasificiran v *L. gasseri*). Seva *L. gasseri* K7 in LF221 se razlikujeta po plazmidnem profilu, profilu RAPD, rastnih karakteristikah, nivoju proizvodnje bakteriocinov ter po delovanju *in vivo* (Matijašič in Rogelj, 2000; Stojković, 2003; Matijašič in sod., 2003; Matijašič in sod., 2004, 2006; Rogelj in Matijašič, 2006; Sagaya in sod., 2013; Peternel in sod., 2010). Nedavno razkritje genoma seva K7 s sekvenciranjem nove generacije je razkrilo razliko v 2 nukleotidih med gasericinom K7 B in acidocinom B, kar pomeni razliko v eni aminokislini (glicin/alanin) v aktivni komponenti bakteriocinov obeh sevov (Treven in sod., 2014). Aktivni peptid gasericina K7 B je homologen komplementarnemu peptidu gasericina T (gatX), komplementarni peptid gasericina K7 B pa je homologen aktivnemu peptidu gasericina T (gatA). Kawai in sod. (2000) so uspeli izolirati le peptid gatA, peptida gatX pa ne.

2.2.6 Proizvodnja bakteriocinov - pomemben dejavnik probiotičnega delovanja

Številne raziskave nakazujejo tudi zaščitno vlogo bakteriocinov v črevesu. Predvidevajo, da bakteriocini pripomorejo k naseljevanju novega seva v že poseljeno ekološko nišo, k inhibiciji naseljevanja novih sevov, med katerimi so tudi patogeni, k modulaciji sestave mikrobiote in k vplivu na gostiteljevo črevesno barierno funkcijo ter imunski odziv (Corr in sod., 2009; Messaoudi in sod., 2013). Bakteriocini lahko delujejo tudi kot signalni peptidi, ki sodelujejo pri sporazumevanju med mikroorganizmi v mikrobnih združbah preko mehanizma »quorum sensing« - zaznavanja, vezanega na določeno gostoto bakterijske združbe, ali pa so vpleteni v interakcije s celicami gostiteljevega imunskega sistema (**slika 2**; Dobson in sod., 2012).



Slika 2: Mehanizmi delovanja bakteriocinov v črevesu (Dobson in sod., 2012: 5)

Figure 2: Mechanisms of the bacteriocin action in the gut (Dobson et al., 2012: 5)

2.2.6.1 Vloga bakteriocinov pri naseljevanju seva v že naseljeno ekološko nišo

V prebavnem traktu je velika gostota mikroorganizmov, kar posledično vodi v interakcije med njimi. Interakcije med mikroorganizmi so lahko kooperativne ali antagonistične. Izločanje protimikrobnih peptidov omogoča sevu prevlado nad sevi, ki so za tak peptid občutljivi. Sevi, ki izločajo bakteriocine, tako lahko uravnavajo številčnost vrst znotraj prebavnega sistema (Corr in sod., 2009; Dobson in sod., 2012).

2.2.6.2 Vloga bakteriocinov pri zaviranju invazivnih patogenov

Do nedavnega za zaščitno vlogo bakteriocinov v črevesu ni bilo oprijemljivih dokazov. Corr in sod. (2007) pa so prvi dokazali delovanje bakteriocinov pri zaščiti pred patogenimi mikroorganizmi tudi »*in vivo*«. V miših, okuženih s patogenim sevom *Listeria monocytogenes*, je sev *Lactobacillus salivarius* UCC118, ki izloča dvopeptidni bakteriocin Abp118, zmanjšal okužbo, mutanta brez sposobnosti sinteze in izločanja bakteriocina pa nista izkazala takega učinka.

2.2.6.3 Bakteriocini kot signalni peptidi

Posamezne bakterijske celice v skupnosti komunicirajo med sabo z namenom koordinacije različnih prilagoditvenih procesov, ki vključujejo tekmovanje za hranila,

sodelovanje pri izkoriščanju hranil in adhezijo (Lebeer in sod., 2008). Interakcije takšne vrste vodijo h koordiniranemu vedenju bakterijske združbe.

V zadnjem času raziskovalci posvečajo več pozornosti tudi raziskovanju vloge bakteriocinov pri interakcijah med predstavniki iste vrste ali različnih vrst v mikrobnih skupnostih ter pri morebitnem vplivanju na gostitelja, torej vlogi bakteriocinov kot signalnih peptidov. Slednji sodelujejo pri medbakterijskem signaliziranju preko mehanizma »quorum sensing«, pri tvorbi biofilmov ali pri signaliziranju celic gostiteljevega imunskega sistema (Dobson in sod., 2012; Gillor in sod., 2008). Domnevajo, da imajo nekateri bakteriocini dvojno vlogo glede na njihovo koncentracijo v okolju – pri visokih koncentracijah kot inhibitorji, pri nižjih koncentracijah pa kot signalne molekule (Dobson in sod., 2012).

2.2.7 Izolacija bakteriocinov

Za določitev biokemijske strukture bakteriocinov potrebujemo čist ter homogen peptid v zadostni koncentraciji. Zaradi heterogenosti bakteriocinov ne obstaja enoten protokol čiščenja bakteriocinov, pač pa je bilo razvitih več različnih postopkov.

Izolacija bakteriocinov iz gojišča, v katerega se izločijo, poteka v več korakih. Neodvisno od uporabljenega postopka izolacije, je med procesom izolacije ključen izplen bakteriocinov. Ker so koncentracije bakteriocinov v gojišču relativno majhne, je potrebno najprej optimizirati pogoje proizvodnje bakteriocinov (sestava gojišča, temperatura, čas, pH, aeracija, mešanje, količina inokuluma). Celoten postopek se začne z gojenjem seva v primernem gojišču ter pri optimalnih razmerah za produkcijo bakteriocinov, ki niso nujno identične z optimalnimi razmerami za rast. Sestava gojišča pomembno vpliva na proizvodnjo posameznega bakteriocina. Mlečnokislinske bakterije so mikroorganizmi, ki za svojo rast zahtevajo obogatena gojišča oz. kompleksna sintetična gojišča, zato je izolacija peptidov iz supernatantov takih kultur težavna. Mnoge bakteriocinske molekule reagirajo z ostalimi molekulami, prisotnimi v gojišču in z njimi tvorijo proteinske agregate (Nissen-Meyer in sod., 1992).

Za detekcijo protimikrobne aktivnosti v supernatantih domnevnih proizvajalcev bakteriocinov obstajajo številni presejalni testi, kakor so preskus z liso na agarju (angl.

agar spot test), difuzijska metoda z diski na agarju ali z vdolbinami v agarju in test kritične redčitve na mikrotiterskih ploščah.

Prvi korak pri izolaciji bakteriocinov je koncentriranje supernatanta kulture, ki proizvaja iskani bakteriocin. Za koncentriranje se uporabljajo naslednji postopki: ultrafiltracija, precipitacija z amonijevim sulfatom ali kislinami ter ekstrakcija proteinov z organskimi topili, kot sta butanol in etanol. Čeprav je korak koncentriranja nujno potreben, da se zmanjša volumen vzorca in pridobi bakteriocine iz supernatanta kulture, je delno selektiven. Za pridobivanje čistih bakteriocinov jih je potrebno ločiti od drugih proteinskih komponent s pomočjo tehnik, ki temeljijo na njihovih fizikalno-kemijskih lastnostih.

En najbolj uspešnih postopkov za čiščenje bakteriocinov, ki so ga prvotno razvili Nissen-Meyer in sod. (1992) za izolacijo laktokokcina G, upošteva naslednje njihove lastnosti: nizko molekulsko maso, kationsko naravo in hidrofobnost. Metoda je sestavljena iz naslednjih korakov: gojenje seva, ki proizvaja bakteriocine, v primernem gojišču in optimalnih pogojih za proizvodnjo bakteriocinov; odstranjevanje celic s centrifugiranjem in precipitacija proteinov iz supernatanta z amonijevim sulfatom, čemur sledi sekvenčno frakcioniranje preko več korakov kromatografije, kar vključuje kationsko izmenjavo, hidrofobne interakcije ter tekočinsko kromatografijo za hitro ločevanje proteinov z obrnjenimi fazami (RP-FPLC).

2.2.8 Uporabnost bakteriocinov v industriji in medicini

Tako bakteriocinogeni bakterijski sevi kakor tudi očiščeni ali delno očiščeni bakteriocini imajo potencial uporabe v medicini, pri ciljanem zdravljenju infekcij s patogenimi bakterijami, zato predstavljajo alternativo obstoječim antibiotikom (Dobson in sod., 2012).

Izolirali so številne bakteriocine, zanimive za industrijsko uporabo (De Vuyst in sod., 2007). Očiščeni ali delno očiščeni bakteriocini, kot so nizin (Parada in sod., 2007), enterocin AS-48, lakticin 3147 in pediocin (Arakawa in sod., 2009), se lahko uporabljajo v živilski industriji kot naravni konzervansi (De Vuyst in sod., 2007; Galvez in sod., 2007; Gillor in sod., 2007). Kakor kažejo raziskave gasericina A in gasericina T

so tudi bakteriocini, ki jih proizvajajo bakterije vrste *L. gasseri*, uporabni kot konzervansi v živilski industriji (Arakawa in sod., 2009).

Uporaba bakteriocinov se je razširila tudi na področje medicine in farmacije, kjer se uporabljajo kot farmabiotiki (Dobson in sod., 2012; Gillor in sod., 2008) in/ali kot alternativa za antibiotike ali razkužila (Messaoudi in sod., 2013). Pri tem je poglavitno od koncentracije odvisno delovanje proti patogenim bakterijam (De Vuyst in sod., 2007; Dobson in sod., 2012). Med lastnostmi, zaradi katerih imajo bakteriocine za potencialno alternativo antibiotikom, so njihova učinkovitost protimikrobnega delovanja (*in vitro* in *in vivo*), nizka toksičnost, široka ali ozka specifičnost delovanja, možnost proizvodnje *in situ* in dejstvo, da so uporabni za bioinženiring (Balciunas in sod., 2013; Cotter in sod., 2013). Bakteriocini, ki jih proizvajajo črevesni mikroorganizmi, imajo običajno ozek inhibicijski spekter in so zato primerni kandidati za terapevtsko uporabo. Takšni so na primer turicin CD, abp118 in mikrocin C7, ki so jih pridobili iz črevesnih izolatov. Njihov protimikrobni spekter zajema tudi nekatere patogene vrste, kot so *Clostridium difficile*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* ter *Shigella flexneri* (Cotter in sod., 2013).

2.2.8.1 Testiranje citotoksičnosti bakteriocinov

Relativno malo je znanega o citotoksičnosti bakteriocinov in o njihovih interakcijah z evkariontskimi celicami. Preverjanje citotoksičnosti protimikrobnih peptidov pred uporabo v kakršnekoli klinične namene je nujno potrebno. Maher in McClean (2006) so testirali citotoksičnost galidermina, nisina A, maganina ter melitina, in sicer na dveh celičnih modelih (HT29 in Caco-2). Z merjenjem transepitelijske električne upornosti (TEER) so preverili vpliv protimikrobnih peptidov na paracelularno permeabilnost. Med preiskovanimi peptidi je bil najmanj citotoksičen galidermin, sledili so nizin A, maganin in melitin. Melitin je edini vplival na paracelularno permeabilnost. Raziskave so pokazale, da z izjemo melitina ti peptidi ne porušijo črevesne epitelijske pregrade in so primerni za uporabo pri zdravljenju infekcij prebavnega trakta (Maher in McClean, 2006).

2.3 VPLIV BAKTERIJ RODU *Lactobacillus* NA VZDRŽEVANJE HOMEOSTAZE V ČREVESJU

Črevesje ima značilno histološko zgradbo, ki vključuje sluznico, podsluznico, mišično plast in serozo. Sluznico (tunica mucosa) sestavlja epitelij (lamina epithelialis), propria (lamina propria) in mišična plast, sestavljena iz gladkih mišičnih celic (lamina muscularis mucosae). Absorpcijsko sposobnost črevesja povečajo resice, ki so v dvanajstniku kratke in postajajo vedno daljše proti koncu ozkega črevesa. V širokem črevesu resice niso več prisotne. Resice se končujejo v t.i. Lieberkuhnovih kriptah, na dnu katerih so germinativne oblike enterocitov, ki se ves čas diferencirajo in pomikajo proti vrhu resic. Proprio sluznice tvorijo rahlo vezivo z limfociti T in B (ki oblikujejo tudi limfatične folikle), fibroblasti, tkivni bazofilci, plazmatke, histioci, gladka mišičnina, žile in živci (Bron in sod., 2012; Turner, 2009).

Sloj epitelijskih celic pomembno prispeva k vzdrževanju črevesne homeostaze. Je namreč prva obramba pred mnogimi dejavniki, kot so bakterijski antigeni, drugi antigeni v hrani ter toksini. Črevesne epitelijske celice so prve pomembne tarčne celice za mikrobioto, vključno s probiotičnimi mikroorganizmi. Izguba integritete, ki vodi v moteno delovanje epitelijske pregrade in posledično aktivacijo mukoznega imunskega odziva, je tesno povezana s patogenezo črevesja in različnimi bolezenskimi stanji, vključno s kroničnimi vnetnimi črevesnimi boleznimi (IBD – iz angl.: irritable bowel disease), sindromom razdražljivega črevesja (IBS – iz angl.: irritable bowel syndrome), alergijami na hrano, celiakijo, sladkorno boleznijo tipa I ter okvarami jeter (Neish in sod., 2002; Suzuki, 2013). Posledično so se razvili številni imunski in drugi obrambni mehanizmi za zaščito pred potencialno škodljivimi snovmi iz črevesne svetline. Te mehanizmi razdelimo v dva med seboj koordinirana nivoja, ki vključujeta imunske (imunske in epitelijske celice) kot tudi neimunske komponente (črevesno peristaltiko, mukozni sloj in izločanje vode).

2.3.1 Struktura črevesnega epitelijskega sloja

Črevesni epitelij je sestavljen iz enojnega sloja celic in je primarna površina, ki služi kot fizična pregrada med črevesno vsebino ter mikrobioto in imunskimi celicami v spodaj

ležečem sloju, imenovanem »lamina propria« (O'Callaghan in sod., 2012; Lakshminaryanan in sod., 2013; Suzuki, 2013). Celice, ki sestavljajo epitelij, imajo naslednje funkcije: izločajo mukus in prebavne encime, ki sodelujejo v procesu prebave, uravnavajo prehajanje ionov in hranil, omejujejo dehidracijo in pomagajo pri premikanju črevesne vsebine skozi prebavila (Neish in sod., 2002).

2.3.1.1 Zunajcelične komponente črevesne pregrade

Prvo obrambno linijo črevesja predstavlja sloj sluzi - mukusa, ki pokriva epitelij in vsebuje različne varovalne in protibakterijske snovi, ki jih izločajo epiteljske celice npr. komponente komplementa, mucine, encime in defenzine. Dokazali so, da defenzini niso odgovorni samo za preprečevanje invazije patogenov, ampak so tudi udeleženi pri uravnavanju sestave mikrobiote in oblikovanju pridobljenega imunskega odziva. Mukus zmanjšuje izpostavljenost monosloja črevesnih epiteljskih celic raznim silam delcev iz črevesne svetline ter preprečujejo direkten stik epitelijske celice z mikroorganizmi (Neish in sod., 2002; Bron in sod., 2012).

2.3.1.2 Celice epitelijske

Epitelij je sestavljen iz številnih tipov diferenciranih epiteljskih celic. Štiri glavne funkcionalne skupine polariziranih epiteljskih celic so:

- podolgovate absorpcijske celice oz. enterocite, katerih apikalna membrana je oblikovana v mikrovile,
- čašaste celice, ki proizvajajo mukus,
- Panethove celice, ki izločajo proti-mikrobne snovi,
- različne endokrine celice ter
- celice M.

Prevladujejo enterociti, ki tvorijo strukturni epitelij, v katerem se nahajajo tudi drugi celični tipi. Glavna funkcija enterocitov je prebavna in pregradna funkcija. Mukus prekriva epitelij želodca, tankega in debelega črevesa. Njegova glavna naloga je omejiti stik med mikrobi, prisotnimi v svetlini in epiteljskimi celicami. Vzorčenje bakterijskih celic preko epitelijske poteka preko specializiranih membranskih epiteljskih celic (celic M) in dendritskih celic (O'Callaghan in sod., 2012). Specializirane čašaste celice

izločajo mukus, ki pogosto vsebuje sekretorne imunoglobuline, ki v sodelovanju s peristaltiko črevesja izločijo bakterije, ujete vanj. Panethove celice v črevesno svetlino izločajo protimikrobne snovi (defenzini, fosfolipaze, laktoferin, lizocim), ki sodelujejo z imunskim sistemom črevesja. Celice M so del epitelijskih foliklov, ki so povezani s spodaj ležečim sluzničnim limfoidnim tkivom, kjer so limfociti B in T ter druge imunске celice. Celice M so pomembne za prevzem antigenov ali mikrobov iz črevesne svetline in prenos le-teh do limfoidnega tkiva (Turner, 2009; Bron in sod., 2012).

2.3.1.3 Kompleks apikalnih stikov

Epitelijske celice črevesnega epitelijskega tkiva tvorijo kontinuiran, polariziran monosloj, kjer so membrane posameznih celic povezane z drugimi preko kompleksa apikalnih stikov. Ta medcelični kompleks je sestavljen iz tesnih stikov (TJ - iz angl.: tight junctions), adherentnih stikov, dezmosomov in presledkovnih stikov za medcelično komunikacijo.

Tesne stike tvori večproteinski kompleks, sestavljen iz transmembranskih proteinov (okludin, klavdini in adhezijske molekule) ter perifernih membranskih proteinov (ZO – iz angl.: zonula occludens). Tesni stiki so glavna fizična pregrada, ki vpliva na paracelularno prepustnost med epitelijskimi celicami. Tesni stiki regulirajo paracelularni prehod in vzdržujejo apikalno in bazolateralno polariziranost. Služijo kot obramba pred lateralno difuzijo celičnih membranskih proteinov (Anderson in sod., 2001; Sharma in sod., 2010).

Pomemben transmembranski protein tesnih stikov je 65 kDa velik okludin, ki ima štiri transmembranske regije. Amino-konec okludina se v celici povezuje s proteinoma ZO-1 in ZO-2. V homeostazi je okludin maksimalno fosforiliran na ostankih Ser in Thr, medtem ko fosforilacija ostankov Tyr ostane minimalna. Pri motnjah v tesnih stikih pod vplivom dražljajev na okludinu poteka defosforilacija na Ser/Thr ostankih, kar posledično vodi v prerazporeditev proteinov iz membrane v citoplazmo. Natančna vloga fosforilacije Tyr pri razpadu tesnih stikov še ni točno poznana, ampak predvidevajo, da naj bi zmanjšala interakcijo med okludinom in ZO, kar vodi v razpad tesnih stikov (Martinez in sod., 2011). Veliko raziskav je pokazalo, da je endocitoza okludina pogost

pojav pri poškodbah tesnih stikov in je tesno povezana s fiziološkim porušenjem epitelijske pregrade (Yu in sod., 2008; Suzuki, 2013).

Klavdini so družina transmembranskih proteinov, velikih med 20 in 27 kDa, ki imajo pomembno vlogo pri koordinaciji barierne funkcije. Njihovo različno izražanje in lastnosti določajo tkivno-specifično nihanje v električni upornosti in medcelični prepustnosti ionov. Raziskave črevesa človeka so pokazale izražanje klavdina-1, -3, -4, -5 in -7 v mukozni vitegi črevesa (ileum) in debelega črevesa (kolon), ter komaj zaznavno izražanje klavdina-2, omejenega na kripte debelega črevesa (Suzuki, 2013).

Transmembranski proteini klavdini in okcludin so strukturno povezani preko proteinov ZO s citoskeletom, ki ga sestavljajo aktin, miozin II in drugi proteini. Kljub kompleksni zgradbi apikalnih ter tesnih stikov le-ti nimajo statične strukture. Posledično lahko hitro pride do njihove reorganizacije, kot odziva na različne zunajcelične dražljaje. Internalizacija proteinov apikalnih in tesnih stikov je mehanizem, ki zmanjša medcelično adhezijo in povzroči reorganizacijo medceličnih stikov. Internalizacijo povzročijo naslednji patofiziološki dejavniki: mikrobní virulenčni dejavniki, pro-vnetni citokini ter oksidativni stres (Sharma in sod., 2010; Suzuki, 2013).

2.3.2 Uravnavanje prepustnosti sloja epitelijskih celic črevesa

Pregrada iz epitelijskih celic je izjemno dinamična in funkcionalno odzivna na številne fiziološke, patološke in farmakološke dražljaje. Tesni stiki v črevesu se konstantno spreminjajo zaradi dejavnikov v prehrani, nevro-humoralne signalizacije, vnetnih mediatorjev in številnih celičnih signalnih poti. Okrepitev epitelijske pregrade je mehanizem, s katerim lahko številne probiotične bakterije omejijo prehod tujih antigenov ali patogenov v črevesu (Martinez in sod., 2012; Suzuki, 2013).

Epitelijske celice omogočajo selektivno prepustnost preko dveh poti: transcelularne in paracelularne poti. Transcelularna je pomembna pri absorpciji in transportu hranil, vključno s sladkorji, aminokislinami, peptidi, maščobnimi kislinami, minerali in vitamini. Ker je celična membrana nepropustna, ta proces poteka preko posebnih transporterjev ali kanalov, ki se nahajajo na apikalni in bazolateralni membrani. Paracelularna pot pa omogoča transport preko medceličnega prostora med dvema

sosednjima celicama. Ta proces je reguliran s posebnim apikalnim kompleksom, ki ga sestavljajo tesni stiki in adherentni stiki. Adherentni stiki, skupaj z dezmosomi, tvorijo močno vez med epitelijskimi celicami in pripomorejo k medcelični komunikaciji, vendar ne določajo paracelularne prepustnosti. Tesni stiki obkrožajo apikalne konce lateralne membrane epitelijskih celic in določajo selektivno paracelularno prepustnost (Suzuki, 2013).

Epitelijska pregrada in paracelularna permeabilnost sta dinamično regulirani z različnimi zunajceličnimi dražljaji (citokini, rastni faktorji, patogeni, hranili in ostalimi faktorji v hrani) in tesno povezani z raznimi boleznimi. Porušenje tesnih stikov, povečana paracelularna prepustnost in posledično prehajanje provnetnih molekul iz črevesne svetline lahko aktivirajo mukozni imunski sistem, kar povzroči vnetje in poškodbe tkiva. Rezultati bazičnih raziskav in kliničnih študij kažejo, da imajo tesni stiki v črevesu ključno vlogo pri patogenezi črevesnih in sistemskih bolezni. Integriteto tesnih stikov in prepustnost ovrednotimo z merjenjem transepitelijske električne upornosti in paracelularnega prehoda majhnih molekul, kot so manitol, dekstran in inulin (Suzuki, 2013).

2.3.2.1 Proučevanje epitelijske pregradne funkcije *in vitro* - celični model Caco-2

Celice Caco-2 so razširjen model za raziskovanje strukturnih ter funkcionalnih lastnosti diferenciranih enterocitov. Primerne so za študije transporta ter absorpcije zdravil in antibiotikov, spremljanje ekspresije citokinov, proteinov toplotnega stresa in ostalih celičnih produktov, intracelularnega transporta proteinov, metabolizma poliaminov, adhezije različnih lektinov ter adhezije, invazije in translokacije bakterij.

V raziskavah probiotikov se zelo pogosto uporablja celična linija Caco-2 (American Type Culture Collection; ATCC HTB-37), ki je izolirana iz človeškega adenokarcinoma debelega črevesa. Čeprav celična linija izvira iz debelega črevesa, se celice diferencirajo v enterocite in jih lahko uporabljamo kot model za epitelij človeškega tankega črevesa. Diferenciacija celic se začne po tem, ko celice dosežejo konfluenco, kar pomeni, da prerastejo celotno površino, ki jo imajo na razpolago in se med seboj tesno stikajo. Znak diferenciacije je vzpostavitev polarnosti celice, ki jo opazimo po prisotnosti mikrovilov na apikalni strani celic in po dobro vidnih tesnih stikih med celicami. Zelo značilno je

tudi, da tvorijo strukture za transport snovi iz apikalne strani na bazolateralno stran. Funkcionalno prepoznamo diferenciacijo po aktivnostih različnih encimov na apikalni strani (alkalna fosfataza, invertaza-izomaltaza, ornitin dekarboksilaza, diamin oksidaza in aminopeptidaza). Diferenciacijo preverjamo tudi z merjenjem transepitelijske električne upornosti monosloja celic. Za merjenje TEER gojimo celice na poroznih filtrih, ki omogočajo dostop do apikalnega in bazolateralnega področja celic. Monosloj postane električno aktiven šele po nastanku tesnih stikov med celicami. Celice rastejo v eni plasti in se strukturno in funkcionalno preoblikujejo, ko pride do stikanja med njimi. V procesu preoblikovanja se celice podaljšajo in polarizirajo, tako da se oblikujeta bazolateralna in apikalna stran, na slednji se izoblikujejo črevesne resice. Prisotnost hidrolaz apikalne »ščetkaste« meje nam služi kot dokaz, da so se celice preoblikovale (Bianchi in sod., 2004; Pinto in sod., 1983).

2.3.3 Imunski odziv v črevesju

2.3.3.1 Glavne celice imunske obrambe v črevesju

Čeprav epitelijske celice predstavljajo primarno bariero, lastnosti in funkcije le-te niso omejene samo na epitelijske celice, ampak so rezultat sodelovanja z imunskimi celicami. Epitelijske celice črevesa izločajo predvsem interleukin-8 (IL-8), kemotaktični citokin z zelo pomembno vlogo pri imunosti in vnetnih reakcijah (Martinez in sod., 2011).

Imunski odziv se aktivira in odziva na mikrobe v več stopnjah. Prva obrambna linija je fizikalno-kemijska pregrada, druga linija je naravna imunost, ki je antigensko nespecifična vendar stalno prisotna in aktivna. Tretja linija imunske obrambe je pridobljena imunost, ki je antigensko specifična in se aktivira s časovnim zamikom in je najbolj učinkovita. Za naravno imunost je značilno, da imunske in nekatere druge celice, ki prihajajo v stik z mikrobi, prepoznajo njihove značilne molekule, ki jih imenujemo MAMP (iz angl.: microbial-associated molecular patterns), po sestavi pa so lipopolisaharidi (LPS), flagelin, peptidoglikani in peptidi. Gostiteljske celice so za prepoznavanje teh molekularnih motivov opremljene z receptorji naravne imunosti, imenovanimi PRR (iz angl.: pattern recognition receptors). Največja skupina PRR so

receptorji, podobni Tollu (TLR – iz angl.: Toll-like receptors). Črevesna mukoza je stalno v stiku z mikroorganizmi in zato bogato opremljena s PRR. Aktivacija mukoznega imunskega sistema temelji na interakcijah med receptorji PRR in ligandi PAMP (iz angl.: pathogen associated molecular patterns), kar se odraža v povečani količi protiteles IgA, diferenciaciji limfocitov T in izločanju citokinov, z namenom izločanja patogenih mikroorganizmov iz črevesja (Sharma in sod., 2010).

Črevesni epitelij ima poleg tega, da je udeležen pri absorpcijskih, prebavnih in sekretornih procesih, tudi pomembno obrambno vlogo prek interakcij z imunskim sistemom.

Druge pomembne obrambne celice v črevesju so makrofagi. Nastanejo iz monocitov, ki se razvijejo iz matičnih celic v kostnem mozgu. So velike, ameboidne celice, premera 10 – 15 µm, z velikim ledvičastim jedrom in zrnato citoplazmo, ki vsebuje lizosome, fagocitne vakuole in citoskeletne elemente. Iz kostnega mozga vstopijo monociti v krvni obtok, nato pa migrirajo v tkiva in se diferencirajo v tkivne makrofage. Celica se poveča 5-10-krat, poveča pa se tudi število celičnih organelov, posebej lizosomov. Njena fagocitna aktivnost močno naraste in producirajo se velike količine hidrolitičnih encimov.

Makrofagi, velike fagocitne ter regulatorne celice, imajo pomembno vlogo pri naravni (kot antigen predstavitvene celice) in pridobljeni celično posredovani imunosti (so celice s sposobnostjo ubijanja tumorskih in uničevanja mikrobnih celic). Njihova aktivnost se vrši s fagocitozo mikrobov in preko produkcije različnih citokinov, kar pomeni, da je količina sproščenih citokinov pokazatelj njihove aktivacije (Haza in sod., 2003). Razporejeni so po celem telesu, bodisi kot potujoči ali pritrjeni v tkivih. V različnih delih telesa dobijo pritrjeni makrofagi različne oblike in funkcije.

Osnovne funkcije makrofagov so naslednje:

- Fagocitoza vseh tujih snovi, kot so mikroorganizmi, makromolekule in celo telesu lastna tkiva, ki so poškodovana ali odmrta. Te snovi prepoznajo z s PRR. Fagocitozi sledi razkroj tujkov s pomočjo encimov proteaz, nukleaz, lipaz in lizocimov.

- Proizvodnja citokinov.
- Predstavljanje antigenov specifičnim limfocitom T. Tuji antigeni so vezani na površini makrofagov v takšni obliki, da jih limfociti T prepoznajo.
- Sodelovanje pri odstranjevanju tujih antigenov s pomočjo protitelesnega imunskega odziva (fagocitoza opsoniziranih tujkov) (Abbas in sod., 1989).

Tretja skupina so dendritske celice, ki iztegujejo svoje podaljške skozi tesne stike med črevesnimi epitelijskimi celicami, kar jim omogoča lovljenje mikroorganizmov v črevesni svetlini. Iztegovanje dendritov v lumen je omogočeno s signali, ki jih posredujejo kemokinski receptorji CX3CR1, iztegovanje podaljškov dendritskih celic pa ojača še signaliziranje receptorjev TLR na črevesnih epitelijskih celicah. Peyerjeve plošče (PP) so organizirano limfatično tkivo v steni tankega črevesa, ki vsebujejo limfatične folikle, napolnjenke z limfociti B, in interfolikularne populacije limfocitov T. Lamina propria vsebuje veliko število limfoidnih in mieloidnih celic, predvsem imunoglobulin A pozitivnih (IgA+) plazmatk, razporejenih pod črevesnim epitelijem (Abbas in sod., 1989).

2.3.3.2 Citokini

Citokini so skupina majhnih (< 30 kD) proteinov, ki jih izločajo celice, kot so limfociti (celice T_H) in makrofagi. Citokini uravnavajo razmnoževanje, diferenciacijo in preživetje celic. Citokini se vežejo s specifičnimi receptorji na membrano tarčne celice, pri čemer sprožijo signal, ki se prenese v notranjost celice in spremeni izražanje genov v njej. Na splošno se citokini vežejo na receptorje z močno afiniteto, zato lahko posredujejo biološke učinke že v pikomolarnih koncentracijah. Med številnimi fiziološkimi odzivi, za katere je potrebna udeležba citokinov, je razvoj humoralnega in celično posredovanega imunskega odziva, sprožitev vnetja, uravnavanje hemopoeze, uravnavanje celičnega razmnoževanja in diferenciacije ter zdravljenje ran. Glede na strukturo delimo citokine v družine hematopoetinskih, interferonskih, faktorjev tumorske nekroze (TNF) in kemokinov (Vozelj, 2000).

- Interlevkin-1 (IL-1)

IL-1 izdelujejo makrofagi, monociti, limfociti B, dendritske celice in celice endotelija. Tarčne celice so celice T_H in limfociti B. Poznamo dve obliki, IL-1 α in IL-1 β , ki ju kodirata dva različna gena. Sta ključna vnetna citokina in imata osrednji pomen v imunskem odzivu. Stimulirata aktivacijo celic T_H, in s tem vplivata na zorenje in klonsko ekspanzijo limfocitov B, povečata aktivnost celic NK (celic naravnih ubijalk), privabljata makrofage in nevtrofilce s pomočjo kemotakse in v jetrih pospešita nastajanje proteinov akutne faze. V nekaterih primerih je učinek neposreden, v drugih pa posreden prek spodbuditve drugih citokinov, npr. IL-6 ali TNF- α (Vozelj, 2000; Suzuki, 2013).

- Interlevkin 6 (IL-6)

IL-6 izdelujejo monociti, makrofagi in celice T_H2 kot odgovor na izločeni IL-1. IL-6 pospeši razmnoževanje in zorenje celic B. V obtoku ga odkrijemo pri okužbah s po Gramu negativnimi bakterijami, kjer se izloča v odgovor na TNF. Je poglavitni mediator reakcije akutne faze in deluje neposredno na hepatocite, da sintetizirajo CRP (iz angl.: C-reactive protein), komponente komplemента in druge proteine akutne faze (Vozelj, 2000; Suzuki, 2013).

- Dejavnik tumorske nekroze α (TNF- α)

TNF- α izdelujejo makrofagi, celice T, celice NK, astrociti in Kupfferjeve celice v odgovor na bakterije, viruse, različne citokine in imunske komplekse. Je poglavitni posrednik imunskega odziva na po Gramu negativne bakterije, pomemben pa je tudi pri odzivu na druge mikroorganizme. Najpomembnejši celični vir za TNF so z LPS aktivirani mononuklearni fagociti. Pri majhnih koncentracijah spodbudi žilne endotelijske celice k izražanju površinskih adhezijskih molekul, ki napravijo endotelijske celice lepljive za nevtrofilce, monocite in limfocite. To delovanje prispeva k nakopičenju levkocitov v vnetišču. Poleg tega TNF aktivira vnetne levkocite, da ubijejo mikrobo in spodbudi mononuklearne fagocite k izločanju citokinov, predvsem IL-1, IL-6, samega TNF in kemokinov. Vsi ti učinki so pomembni za vnetni odziv na mikrobo (Vozelj, 2000; Suzuki, 2013).

- Citokin IL-8

IL-8 je citokin z močno sposobnostjo kemotakse. Gre za veliko družino strukturno homolognih citokinov, ki stimulirajo levkocite in regulirajo njihovo potovanje iz krvi v tkiva. V različne skupine jih delimo na podlagi števila in lokacije N-terminalnih cisteinskih ostankov. Dve glavni skupini predstavljajo kemokini CC, pri katerih so cisteinski ostanki drug poleg drugega, in kemokini CXC, pri katerih so cisteinski ostanki ločeni z eno aminokislino. Pri procesih vnetja delujejo kemokini CXC v glavnem na nevtrofilce, kemokini CC pa na monocite, limfocite in eozinofilce. Kemokine, ki so vpleteni v vnetne procese kot odgovor na zunanje dražljaje, proizvajajo levkociti, tiste, ki regulirajo prehod celic skozi tkiva, pa proizvajajo različne celice v teh tkivih (monociti, limfociti, granulociti, bronhalne epitelijske celice, keratinociti). IL-8 je predstavnik družine kemokinov CXC, ki privabljajo nevtrofilce na mesto vnetja (Abbas in sod., 1989; Vozelj, 2000; Suzuki, 2013).

2.3.3.3 Celični model THP-1 za proučevanje imunskega odziva *in vitro*

THP-1 je monocitna celična linija, pridobljena iz krvi eno leto starega fantka z akutno monocitno levkemijo. Celice so v premeru velike 12 – 14 μm in imajo bazofilno citoplazmo, ki vsebuje majhna azurofilna zrna in nekaj vakuol. Jedro je nepravilne oblike. Po stimulaciji s forbolnim estrom (12-tetradekanoilforbol-13-acetat) se monociti preobrazijo v aktivne makrofage s sposobnostjo pripenjanja na podlago in izločanja citokinov (Tsuchiya in sod., 1980).

Prav pripenjanje na podlago je poleg sprememb v morfologiji celic in izražanju površinskih markerjev (npr. CD14) indikator preobrazbe monocitov v makrofage. Podobne metabolne in morfološke lastnosti celic THP-1 lahko izzovemo tudi z 1,25-dihidroksi vitaminom D3, retinojsko kislino ali določenimi citokini (TNF- α , IFN- γ), vendar se lahko z uporabo različnih sredstev stopnja preobrazbe razlikuje. Diferencirane celice THP-1 so zelo razširjen model človeških makrofagov za proučevanje njihovega metabolizma, procesov vnetja in apoptoze *in vitro* (Tsuchiya in sod., 1980).

2.3.4 Porušeno ravnoesje v črevesnem ekosistemu in učinek probiotikov

Preko interakcije z imunskim sistemom se mikrobiota bori za rast, preživetje in kontrolo nad črevesnim ekosistemom (Sharma in sod., 2010). Porušen ravnotežni odnos med epitelijskimi celicami črevesja in mikrobioto lahko vodi do vnetja, do poškodb tkiv ter različnih bolezni in okužb s patogenimi mikroorganizmi (Neish in sod., 2002).

Za zaščito pred pretiranim vnetnim odzivom gostitelju služi črevesna sluznica, ki ima mehanizme za omejitev rasti bakterij, omeji neposredni stik z bakterijami in preprečuje vdor bakterij v spodaj ležeče tkivo. Motnje v pregradi lahko povzročijo izgubo imunske tolerance do lastne mikrobiote, kar vodi v nastanek neprimernega vnetnega odziva, ki lahko vodi do razvoja kroničnih črevesnih bolezni, kot sta ulcerozni kolitis in Crohnova bolezen. Kronično vnetje je pogosto povezano s spreminjanjem tesnih stikov, kar omogoča prehod mikrobnih antigenov v spodaj ležeče tkivo. Še vedno potekajo razprave, ali so porušeni tesni stiki vzrok ali posledica bolezni. Provnetni citokini pri pacientih z IBD lahko povečajo epitelijsko propustnost, kar povzroči vnetje (Ohland in sod., 2010). Prav tako pa zaradi genetskih nepravilnosti lahko pride do nepravilne regulacije imunskega sistema in oportunisti lahko postanejo patogeni ter tako škodijo gostitelju (Marzorati in sod., 2011).

Kronična vnetja so pogosto povezana z manjšim izražanjem proteinov tesnih stikov, kar vodi do porušanja epitelijske pregrade ter dovoljuje prehod mikrobnih antigenov do spodaj ležečega imunskega sistema. Barierna disfunkcija pri IBS je povezana z manjšim izražanjem proteina ZO-1 in proteosomsko posredovane razgradnje okcludina v mukozi pacientov z IBS. Poleg zmanjšane izražanja proteinov je strukturna in funkcijska sprememba epitelijske pregrade dosežena tudi z endocitozo proteinov tesnih stikov. Monociti in makrofagi sprožijo akutni vnetni odziv na infekcijske agense. Aktivirani makrofagi sproščajo provnetne citokine vključno s $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ in IL-6 , ki so odgovorni za vključevanje nekaterih drugih celic vnetnega odziva in črevesne barierne disfunkcije. Za provnetne citokine, kot je $\text{TNF-}\alpha$, je bilo dokazano, da spodbudijo internalizacijo ZO-1 in okcludina s kaveolarno posredovano endocitozo, kar posledično vodi v izgubo integritete epitelijske bariere (Martinez in sod., 2011).

Rezultati različnih bazičnih in kliničnih študij kažejo, da imajo lahko probiotiki številne pozitivne učinke na sistemske in črevesne bolezni. Študije *in vivo* ter *in vitro* so dokazale, da določeni probiotiki ščitijo epitelijsko pregrado pred stresom, okužbami ter pretiranim izločanjem citokinov (Suzuki, 2013). Mehanizmi, preko katerih probiotiki ščitijo gostitelja pred patogenimi bakterijami, so direktni antagonizem patogenih bakterij preko izločanja protimikrobnih snovi, okrepitev epitelijske pregrade in kompetitivno izključevanje preko povečanega izločanja mukusa ter imunomodulacija preko aktivacije imunskih celic (Corr in sod., 2009; Ohland in sod., 2010).

2.3.4.1 Mehanizem delovanja probiotičnih laktobacilov

Probiotične bakterije so pomembne pri vzpostavitvi črevesne epitelijske pregrade, vendar mehanizem še ni popolnoma raziskan. Obstoječe študije so se osredotočile na raziskovanje sposobnosti probiotičnih sevov, da preprečujejo spremembe v izražanju in razporeditvi tesnih stikov pri modelih raznih bolezenskih stanj (Anderson in sod., 2010).

V številnih študijah so raziskovali bakterijske celice ter molekule sevov rodu *Lactobacillus*, ki pripomorejo k optimalnemu delovanju črevesnega epitelijskega v povezavi s privzemom hranil in pregradno funkcijo. Probiotični laktobacili naj bi okrepili epitelijsko pregrado s številnimi mehanizmi, kot so indukcija izločanja mucinov, okrepitev tesnih stikov, povečanje izražanja proteinov »heat shock« in preventiva pred apoptozo epitelijskih celic. Poleg funkcije absorpcije hranil in fizične bariere črevesne celice aktivno sodelujejo pri imunskem odzivu. Skupaj z dendritskimi celicami in makrofagi so konstantno v stiku z okoljem in koordinirajo številne obrambne mehanizme z namenom zaščite mukoznega tkiva. V nekaterih primerih so bile signalne poti identificirane, vendar so celice ter izločene molekule laktobacilov in njihovi receptorji še vedno predmet raziskovanja (Lebeer in sod., 2008).

Proteinska kinaza C (PKC – iz angl.: protein kinase C) je osrednja molekula, ki je odgovorna za regulacijo integritete epitelijskega črevesa, kot odgovor na bakterije v črevesni svetlini. Nastanek tesnih stikov je reguliran selektivno preko PKC. Specifična tarča delovanja PKC naj bi bili proteini ZO-1. Družina PKC je sestavljena iz najmanj 11-ih izocimov, ki so razporejeni po tkivu in v celici ter uravnavajo različne celične funkcije

in imunske odzive. Mehanizmi regulacije PKC-izocimov vključujejo fosforilacijo, ki uravnava aktivnost encima (Cario in sod., 2004).

V številnih raziskavah *in vitro* na celičnih linijah je bilo dokazano, da probiotični laktobacili lahko pozitivno vplivajo na razporejanje tesnih stikov ter tako prispevajo k povečanju transepitelijske upornosti (Klingberg in sod., 2005; Messaoudi in sod., 2013). Miyauchi in sod. (2012) so ugotovili, da se sevi vrste *Lactobacillus salivarius* zelo razlikujejo v sposobnosti zaščite črevesne bariere zaradi različne aktivacije znotrajceličnih signalnih poti. Seva *L. salivarius* UCC118 in CCUG38008 sta zaščitila črevesno barierno funkcijo Caco-2 celične kulture preko indukcije fosforilacije ERK (iz angl.: extracellular signal-regulated kinase). Sev *L. salivarius* AH43324 pa je sprožil fosforilacijo aktina in signalne molekule p38 in ni pripomogel k zaščiti barierne funkcije. Številni primeri dokazujejo, da je vpliv probiotičnih laktobacilov na TEER sevno specifičen.

Izpostavljenost kulture epitelijskih celic bakterijskim lipopeptidom in peptidoglikanom ima za posledico večje izražanje proteinov ZO-1 na apikalni strani in posledično povišano TEER (Abreu in sod., 2005). Na celicah kulture Caco-2 je *Lactobacillus plantarum* WCFS1 preprečil padec TEER porušene epitelijske bariere s TNF- α in forbolnimi estri, preko zaviranja signalne poti NF- κ B. *Lactobacillus rhamnosus* OLL2838 je pri celični kulturi Caco-2 preprečil padec TEER ter normaliziral izražanje ZO-1 in MLCK, sproženo s TNF- α . Sočasna stimulacija s TNF- α in IFN- γ je škodovala barierni integriteti celic Caco-2, kar se je pokazalo kot padec TEER in prerazporeditev ZO-1. *L. rhamnosus* GG je ščitil epitelijsko pregrado pred okužbami in citokini ter tako preprečil porušenje epitelijske integritete (Suzuki, 2013).

Nedavne raziskave vpliva predstavnikov vrste *Lactobacillus plantarum* na transkripcijo genov v črevesu *in vivo* so pokazale, da so bile inducirane številne regulatorne poti NF- κ B. Odziv je bil odvisen od rastne faze celice. Primerjali so tudi vpliv sevov iz vrst *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* in *Lactobacillus rhamnosus*. Predstavniki različnih vrst so spodbudili različen imunski odziv. Vendar so bile razlike v odzivu, povzročene s strani sevov iste vrste v različnih osebkih, večje kot razlike med odzivi različnih sevov znotraj enega osebka. Izpostavitve celic Caco-2 sevu *L.*

rhamnosus je sprožila pot NF- κ B, inhibirala degradacijo I κ B α (iz angl.: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) in zmanjšala izločanje IL-8, povzročeno zaradi izločanja TNF- α (O'Callaghan in sod., 2012).

2.3.4.1.1 Vpliv vrste *Lactobacillus gasseri* na pregradno funkcijo črevesnega epitelijskega

Novejše raziskave so dokazale pomemben vpliv vrste *Lactobacillus gasseri* na vzdrževanje homeostaze v črevesu. En način regulacije gostiteljevega metabolizma je preko proizvodnje kratkoverižnih maščobnih kislin. Uživanje seva *L. gasseri* CECT5714 in *L. coryniformis* CECT5711 dnevno 4 tedne je vplivalo na povečanje koncentriranja butirata v človeškem črevesu. Druga študija je preiskovala učinkovitost uporabe kombinacije *L. gasseri* in *Bifidobacterium longum* (Omniflora) pri akutni diareji. Zdravljenje s kombinacijo teh dveh mikroorganizmov je zmanjšalo trajanje in obseg akutne diareje (Selle in Klaenhammer, 2013).

2.3.4.2 Vpliv ostalih dejavnikov na prepustnost epitelijske pregrade

Propustnost tesnih stikov poleg mikroorganizmov uravnavajo številni dejavniki, kot so forbolni estri, pro-vnetni citokini, Ca²⁺, ATP in bakterijski toksini.

Forbol-12,13-dibutyrate (PDB - iz angl.: phorbol 12, 13-dibutyrate) spodbudi proteinazno kinazo C (PKC), ki sproži povečanje permeabilnosti. PKC naj bi uravnavala propustnost tesnih stikov preko krčenja celičnega aktinsko-miozinskega obroča (Vermeulen in sod., 2011).

Internalizacija okcludina, kot posledica delovanja TNF- α , je specifično posredovana s kaveolarno endocitozo. Vezikularni transport ima pri regulaciji tesnih stikov črevesnega epitelijskega, kot odziva na citokinsko posredovano barierno disfunkcijo, pomembno vlogo.

2.3.4.3 Vpliv bakteriocinov na pregradno funkcijo črevesnega epitelijskega

Epitelijska barierna funkcija pa ni podvržena delovanju katerikoli probiotičnih ali komezalnih mikroorganizmov, ampak je odvisna od molekul, ki so specifične za določen sev in ki jih je potrebno še raziskati (Lakshminarayanan in sod., 2013). Vplive

bakteriocinov na epiteljske in imunske celice v črevesu so začeli proučevati šele v zadnjem času.

Di Cagno in sod. (2010) so dokazali, da očiščeni ali kemijsko sintetizirani plantaricin A (PlnA) zviša TEER pri celicah Caco-2. Prav tako je PlnA zmanjšal negativni učinek IFN- γ na viabilnost Caco-2/TC7 celice in integriteto tesnih stikov. O'Callaghan in sod. (2012) so dokazali, da adhezija na epiteljske celice sproži večje izražanje genov za bakteriocine v sevu *L. salivarius* UCC118.

Meijerinck in sod. (2010) ter van Hemert in sod. (2010) so identificirali številne gene vrste *Lactobacillus plantarum*, katerih produkti bi lahko vplivali na imunski odziv dendritskih in perifernih monojedrnih krvnih celic (PBMC). Delecija genov iz genoma seva *Lactobacillus plantarum* WCFSI je imela za posledico spremembe v citokinskem profilu celičnih kultur. Večina identificiranih genov je sodelovala pri tvorbi in/ali izločanju bakteriocinov. Avtorji obeh študij predvidevajo, da bi bakteriocini, ki jih izloča *L. plantarum*, lahko vplivali na imunski sistem na podoben način kot protimikrobni peptidi, ki jih izločajo črevesne celice človeka.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Agar-agar (Merck, 1.01613)

BHI, Brain Heart Infusion (Merck, 1.10493)

BHI, Brain Heart Infusion (Merck, 1.13825)

Biamonijev hidrogen citrat (Merck, 1.01154)

Bioreaktor (3.7 dm³, Bioengineering)

DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich, D5648)

FBS, serum govejega zarodka (Gibco, 10106-169)

FBS (Sigma, F7524)

Forbol 12, 13-dibutirat (PDB) (Sigma-aldrich, P1269)

Gentamicin (Gibco, 15750-037)

Glicerol (Merck, 4094)

Glukoza (Kemika, 9856)

Goveji serumski albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, A7030)

Kalijev klorid (Merck, 1.04936)

Kvasni ekstrakt (Biolife, 4122202)

Konfokalni mikroskop (Leica, TCS SP5)

L-glutamin (Sigma-Aldrich, G-8540)

Lipopolisaharidi (LPS) iz *E. coli* (Sigma-Aldrich, L4391)

Manganov sulfat monohidrat (Merck, 1.05941)

Mesni ekstrakt (Merck, 1.03979)

Metanol (Merck, 1.06009)

Mikrotitrerske plošče s 96 jamicami (Nunc MaxiSorp, eBioscience, 439454)

MRS, De Man, Rogosa, and Sharpe (Merck, 1.0660)

MRS, De Man, Rogosa, and Sharpe (Merck, 1.10661)

MRS, De Man, Rogosa, and Sharpe (Biolife, 401729)

M17 (Merck, 1.15029)

Natrijev acetat trihidrat (Merck, 1.06267)

Natrijev hidrogen karbonat NaHCO_3 (Kemika, 14467)

Natrijev klorid (Merck, 1.06404)

Na-piruvat (Sigma, S8636)

Pankreatin (Sigma-Aldrich, P3292)

Pepsin (Sigma-Aldrich, P-700)

Plastenke za gojenje celičnih kultur s površino 75 cm^2 (Sarstedt, 83.1813.002)

Plošče za gojenje celičnih kultur z vstavki s polietilenskimi membranami (Corning, 3470, 3460)

RCM, Reinforced Clostridium Medium (Merck, 1.05411)

Rifampicin (Calbiochem, 557303)

RPMI-1640 (Sigma, R5886)

TFA (trifluorocetna kislina) (Sigma-Aldrich, T4885)

Trypton (Biolife, 4122902)

Tripansko modrilo (Merck, 1.11732.0025)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T-9284)

Trizol reagent (Life Technologies, 15596026)

Tween 20 (Biolife, 42120501)

Tween 80 (Merck, 8.22187.0500)

Sorvall Instruments RC5C (Thermo Scientific)

Stratagene Mx3000P (Stratagene)

Žolčne soli No.3 (Biolife, 4111302)

2-merkaptometanol (Sigma-Aldrich, M-7154)

2-propanol (Sigma-Aldrich, 34863)

3.2 METODE

3.2.1 Priprava inokuluma seva *Lactobacillus gasseri* K7

Sev *Lactobacillus gasseri* K7 (sev K7), ki je bil osamljen leta 1996 na Katedri za mlekarstvo (Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, UL) iz blata 7 dni starega dojenčka, je deponiran v zbirki Inštituta za mlekarstvo in probiotike istega oddelka, pod oznako IM105, ter v mednarodni zbirki Czech Collection of Microorganisms (Brno, Češka), pod oznako CCM 7710. Alikvot seva *L. gasseri* K7 smo vzeli iz zbirke, ga namnožili ter ga do uporabe shranili v tekočem gojišču MRS (Biolife, Italija) z dodatkom 20 % glicerola ter zamrznili pri -80 °C. Pred uporabo v poskusih smo sev dvakrat precepili v tekočem gojišču MRS ter inkubirali 18 h pri 37 °C. Uporabljali smo kulturo s približno 10^9 KE/mL.

3.2.2 Metode ugotavljanja prisotnosti bakteriocinov

Protimikrobno aktivnost v supernatantu kulture, ki smo ga prefiltrirali skozi 0,45 µm filter, ter v frakcijah, pridobljenih po posameznih stopnjah čiščenja gasicinov, smo ugotavljali po spodaj opisanih metodah.

3.2.2.1 Priprava indikatorskega seva za testiranje bakteriocinske aktivnosti

Lactobacillus sakei NCDO 2714

Lactobacillus sakei NCDO 2714 smo zaradi občutljivosti za bakteriocine uporabljali kot indikatorski sev. Shranjen je v zbirki mikroorganizmov NCDO (National Collection of Dairy Organisms, National Institute for Dairying, Reading England) pod oznako NCDO 2714. Pred uporabo seva v poskusih smo ga dvakrat precepili v tekoče gojišče MRS ter inkubirali 18 h pri 30 °C.

3.2.2.2 Metoda kritične razredčitve na mikrotiterskih ploščah

Za semi-kvantitativno ugotavljanje protimikrobne aktivnosti v supernatantu kulture ter v frakcijah po ločitvi z metodo RP-HPLC smo uporabili metodo kritične razredčitve na mikrotiterskih ploščah, kot so že opisali Matijašič in sod. (1998). 18-h kulturo seva *L. sakei* NCDO 2174 smo 10000-krat razredčili v svežem bujonu MRS (1 μ L kulture/10 mL tekočega gojišča MRS). V prvi stolpec lukenj na plošči smo nanесли po 200 μ L MRS bujona, v naslednje stolpce pa po 50 μ L zaporednih 2-kratnih razredčitev vzorcev supernatantov ali kromatografskih frakcij (vsak vzorec v svoji vrstici), ki smo jih pripravili v bujonu MRS, ter po 150 μ L razredčene kulture *L. sakei* NCDO 2174. Plošče smo inkubirali pri 30 °C, dokler OD pri 650 nm v zadnjem stolpcu ni dosegel vrednosti med 0,4 in 0,6. Prva kolona je služila za umerjanje spektrofotometra. Enota bakteriocinske aktivnosti (AU/mL) je predstavljala količino bakteriocinov, ki je povzročila >50 % inhibicijo seva *L. sakei* NCDO 2174 v primerjavi s kontrolo (zadnji stolpec), ki je bila brez bakteriocina.

3.2.2.3 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti s »spot-test«-om na agarju

Metoda je bila povzeta po (Klaenhammer, 1988), z modifikacijami (vzorca ne nanesemo v jamico ampak na površino posušenega agarja) po Matijašič in sod. (1998). Rastaljeni agar MRS smo prelili v petrijeve plošče ter ga dobro osušili. V 4 mL rastaljenega poltrdega agarja (7,5 g/L) smo vmešali 50 μ L 18-urne kulture *L. sakei* NCDO 2174 ter s to mešanico prelili površino osušenega agarja MRS. Nato smo na površino nanesli točkovno po 5 μ L vzorcev (kultura K7, supernatant ter očiščeno aktivno komponento gasericina K7 B). Potem ko so vzorci difundirali v gojišče, smo petrijeve plošče inkubirali pri 30 °C 18 ur. Po inkubaciji smo plošče pregledali. Prisotnost inhibicijskih con na področju nanosa vzorcev je kazala na prisotnost protimikrobnih snovi, ki zavirajo rast indikatorskega seva. Rezultat smo navedli kot premer cone inhibicije.

3.2.3 Analiza protimikrobne aktivnosti ter izražanja genov za gasericina K7 A in K7 B

3.2.3.1 Gojenje *L. gasseri* K7 v modificiranem MRS z dejavniki, značilnimi za razmere v prebavilih

Sposobnost izražanja genov za gasericina K7 A in K7 B seva K7 ter proizvodnje bakteriocinov smo spremljali *in vitro* v tekočem gojišču MRS, modificiranim z različnimi dejavniki (Granger in sod., 2008), značilnimi za okolje želodca (pH=3, pepsin (3 g/l), soli (125 mM NaCl + 7 mM KCl + 45 mM NaHCO₃ (Fernandez in sod., 2003)) oziroma črevesa (pH=8, 0,3 % žolčne soli, 0,1 % pankreatin (Fernandez in sod., 2003)). *L. gasseri* K7 smo pred poskusom 2-krat zapored precepili, kot je opisano v poglavju 3.1. Za tem smo 1 % 18-urne kulture prenesli v 200 mL tekočega gojišča MRS (kontrola) ter v modificirano tekoče gojišče MRS. Vzorčili smo vsake 2 uri v obdobju 10 ur, po 10 mL vzorca. Število preživelih bakterij (KE/mL) smo ovrednotili z metodo štetja na ploščah. Protimikrobno aktivnost smo ugotavljali s testom kritične razredčitve na mikrotiterskih ploščah.

3.2.3.2 Izolacija RNA

RNA smo izolirali po postopku, ki je opisan v članku Monnet-a in sod. (2008). Celice seva *L. gasseri* K7 smo pridobili iz 10 mL vzorcev kulture, vzorčene po 2, 4, 6, 8 in 10 h gojenja na 37 °C s centrifugiranjem (9000 x g, 10 min). Resuspendirali smo jih v 1 mL Trizola ter celice razbili in homogenizirali s pomočjo naprave »bead – beater« (Biospec Products) ter cirkonijskih kroglic (diameter, 0,1 mm; Biospec Products) za razbijanje celic. Homogenizacija je potekala 3-krat po 60 s, s hitrostjo 6,5 m/s z vmesnim inkubiranjem na ledu 5 min. RNA smo izolirali iz lizata z »RNeasy Mini Kit« po navodilih proizvajalca. Koncentracijo in čistost izolirane RNA smo preverili z merjenjem absorbance pri 260/280 nm.

3.2.3.2.1 Obdelava z DNazo ter reverzna transkripcija

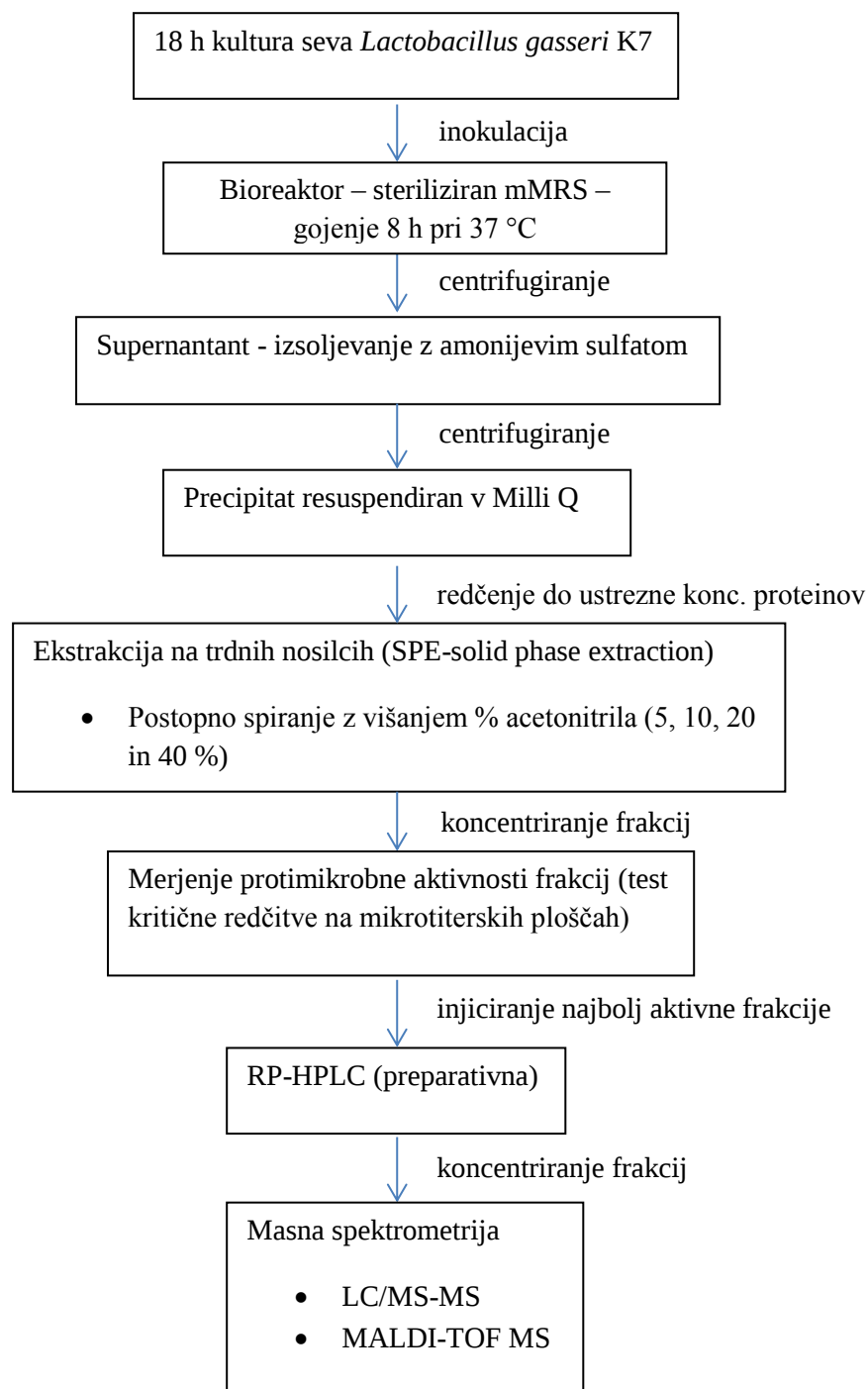
Koncentracijo RNA smo redčili do končne koncentracije 25 ng/μL. Pred reverzno transkripcijo smo vzorce z izolirano RNA obdelali z DNazo z uporabo «RNeasy Mini Kit» po navodilih proizvajalca (Qiagen). Sintezo cDNA smo izvedli z uporabo kompleta reagentov »SuperScript III First-Strand Synthesis System« po navodilih proizvajalca (Thermo Fischer Scientific). Končna koncentracija cDNA je bila umerjena na 2,5 ng/μL. Koncentracijo smo preverili z merjenjem absorbance pri 260/280 nm.

3.2.3.2.2 RT-qPCR

Za analizo izražanja genov za gasericine K7 A in K7 B smo uporabili 8 parov začetnih oligonukleotidov, ki so bili skonstruirani v prejšnji raziskavi (Treven in sod., 2013), par začetnih oligonukleotidov za gen za 16S rRNA pa v tej raziskavi (FW: GGAGGCAGCAGTAGGGAATC, RW: TTTCTTCACTACCAACAGAGCTTTACGA). Pripravili smo reakcijsko mešanico (20 μL), ki je bila sestavljena iz 5 μL cDNA, 25 mM MgCl₂, 0,2 μM začetnih oligonukleotidov in 10 μL 2-kratnega Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix. Za reakcije RT-qPCR smo uporabili aparaturo Stratagene 3000P. Program je bil sestavljen iz naslednjih stopenj: začetna denaturacija (95 °C/10 min), sledilo je 40 ciklov, sestavljenih iz: denaturacije (95 °C/30 s), naleganja začetnih oligonukleotidov (60 °C/30 s) ter podaljševanja verige DNA (72 °C/40 s). Vrednosti C_q so bile določene s programom sistema Stratagene MxPro. Umeritveno krivuljo smo dobili iz vrednosti C_q kot funkcije log cDNA, kjer je bila cDNA zaporedno redčena v razmerju 1:5. cDNA, ki smo jo uporabili za umeritveno krivuljo, smo pridobili z reverzno transkripcijo iz RNA, izolirane iz vzorcev, odvzetih po 8 h inkubacije seva K7 v bujonu MRS. Učinkovitost PCR za vsak par začetnih oligonukleotidov smo izračunali na podlagi naklona umeritvene krivulje. Morebitno kontaminacijo z DNA smo preverili z negativno kontrolo, ki jo je predstavljal vzorec z izolirano RNA, ki ga nismo obdelali z reverzno transkripcijo. Odsotnost podvojevanja DNA v negativni kontroli je pokazala, da vzorci niso bili kontaminirani z DNA. V vsako reakcijo smo vključili tudi kontrolo, ki je vsebovala le reagente in vodo, ne pa vzorca z RNA. Z negativno kontrolo (NTC – iz angl.: non-template control) smo preverili morebitno kontaminacijo sestavin reakcijske mešanice (reagenti in voda). Gen

za 16S rRNA smo uporabili kot referenčni gen za normalizacijo podatkov, pridobljenih s qPCR. Dobljene C_q vrednosti smo uporabili za izračun izražanja izbranih genov z uporabo referenčnega gena in kalibratorja (C_q vzorca po 2 h inkubacije). Pri statistični obdelavi smo upoštevali rezultate 3 bioloških ponovitev s po dvema tehničnima ponovitvama. Za vsak vzorec smo izračunali povprečne vrednosti in standardne odklone.

3.2.4 Proizvodnja, čiščenje in identifikacija gasericinov K7



Slika 3: Shema postopka izolacije gasericinov

Figure 3: Scheme of the bacteriocin isolation procedure

3.2.4.1 Proces proizvodnje bakteriocinov v bioreaktorju

Za proizvodnjo bakteriocinov smo pripravili 2500 mL modificiranega MRS (mMRS) (Stojković, 2003) z naslednjo sestavo:

- 5 g/L mesni ekstrakt
- 15 g/L kvasni ekstrakt
- 5 g/L tripton
- 10 g/L glukoze
- 5 g/L natrijev acetat trihidrat
- 0,05 g/L manganov sulfat monohidrat
- 2 g/L diamonijev hidrogen citrat
- 1 mL/L Tween 80.

Gojišče mMRS smo sterilizirali v bioreaktorju 15 min pri 118 °C. Sledila je inokulacija z 10 % inokulumom kulture *L. gasseri* K7, ki smo jo pred tem gojili čez noč pri 37 °C. Med procesom so bili uravnavani naslednji parametri: pH (5,75) in T (37 °C). Med celotno inkubacijo je potekalo mešanje (350 rpm) ter merjenje optične gostote. Vsaki 2 uri smo sterilno odvzeli 10 mL kulture z namenom merjenja protimikrobne aktivnosti v supernatantu. Po 6-ih in 8-ih urah smo sterilno odvzeli 600 mL kulture ter jo centrifugirali (Sorvall Instruments, RC5C, Thermo Scientific) 15 min pri 15000 x g in 4 °C, da smo odstranili bakterijske celice. Supernatant smo uporabili za izolacijo bakteriocinov.

3.2.4.2 Izolacija gasericinov K7

V supernatant smo dodali amonijev sulfat do 45 % nasičenosti. Suspenzijo smo čez noč konstantno mešali z mešalnim magnetom pri 4 °C, da so se precipitirali proteini. Usedlino, pridobljeno s centrifugiranjem pri 20000 x g in 4 °C za 20 min, smo resuspendirali v destilirani vodi. Le-to smo spustili skozi kolone SPE (Polymeric Reverse Phase resin, 2 g/tube; Phenomenex), ki so bile predhodno ekvilibrirane z metanolom in destilirano vodo. Proteine smo postopoma spirali s 5 %, 10 %, 20 % ter 40 % acetonitrilom in 2-propanolom. Ostanke topil smo odstranili z evaporacijo v centrifugi z evaporatorjem (Genevac, Ipswich, UK). Po evaporaciji organskih topil smo

frakcije resuspendirali v destilirani vodi ter ugotavljali njihovo protimikrobno aktivnost. Frakcijo, dobljeno po spiranju s 40 % acetonitrilom, smo prefiltrirali skozi 0,45 µm filter (Minisart, Sartorius, Göttingen, Germany) in uporabili za nadaljnjo frakcioniranje na preparativni koloni (Jupiter® Proteo semi-preparative column, C12, 4 µm, 90 Å, 21.2 mm i.d. x 250 mm; Phenomenex, CA, USA) sistema HPLC z obrnjenimi fazami (Prominence preparative HPLC system, FRC-10A fraction collector, Shimadzu, Kyoto, Japan). Gradient spiranja je potekal pri 15 mL/min z eluentom A, sestavljenim iz 0,05 % trifluorocetne kisline in vode ter eluentom B, sestavljenim iz 0,05 % TFA ter acetonitrila. Gradient je bil vzpostavljen 15 min po injiciranju 5 mL vzorca z linearnim povečevanjem deleža eluenta B od 5 % do 46 % pri 47 min in od 46 % do 95 % naslednjih 6 min. Vrhove smo detektirali z merjenjem UV absorpcije pri 214 nm. Frakcije po 15 mL smo zbirali od 43. do 63. minute. Ostanek TFA smo odstranili iz frakcij s pomočjo kolon (StratoSpheres™ SPE cartridges PL-HCO₃ MP resin, 500 mg/tube; Agilent Technologies) po navodilih proizvajalca. Po odstranitvi organskih topil smo vsako frakcijo resuspendirali v 500 µl destilirane vode in preskusili njihovo protimikrobno aktivnost z metodo kritične redčitve na mikrotiterskih ploščah z indikatorskim sevom *L. sakei* NCDO 2714. Za določanje koncentracije proteinov smo uporabili metodo po Bradford-u, za kar smo uporabili komplet reagentov (Thermo Fisher Scientific) in upoštevali navodila proizvajalca. Absorbanco smo izmerili s čitalcem mikrotiterskih plošč (Ultra Microplate Reader ELx 808, Bio-Tek instruments).

3.2.4.3 Identifikacija izoliranega peptida z metodami masne spektrometrije

Aminokislinsko zaporedje izoliranih peptidov v frakciji z največjo specifično bakteriocinsko aktivnostjo smo ugotovili z LC-MS/MS. 5 µl frakcije smo razredčili s 50 µl denaturacijskega pufra (6 M urea, 100 mM amonijev bikarbonat), reducirali z dodatkom DTT (DTT – iz angl.: dithiothreitol) (končna koncentracija 10 mM; inkubacija 1 h pri sobni T) in alkilirali z dodatkom jodoacetamida (končna koncentracija 40 mM; inkubacija 1 h pri sobni T v temi). Zatem smo z dodatkom vode zmanjšali koncentracijo uree na 1 M ter dodali 0,2 µg primerno čistega (»sequence grade«) tripsina. Po inkubaciji čez noč pri 37 °C, smo tripsin inaktivirali z dodatkom mravljične kisline (končna koncentracija 0,5 %). Peptide smo izolirali s kolono C18. Vzorci so bili

analizirani z masnim spektrofotometrom LTQ Orbitrap Velos, povezanim z enoto nano-LC HPLC. Peptide smo ločili na analitski koloni picofrit C18 AQUASIL s 40 min gradientom acetonitrila (5 % - 46 %) ob pretoku 300 nL/min. Spektri MS/MS so bili dobljeni s fragmentacijo najbolj intenzivnih prekurzorjev ionov s CID 9. Dobljena zaporedja smo primerjali s tistimi v podatkovni zbirki NCBI s pomočjo programskega orodja Mascot (verzija 1.3.0.339), z nastavitvijo iskanja v zbirki proteinskih zaporedij NCBIInr.

Molekulsko maso peptidov v frakciji HPLC z največjo specifično aktivnostjo smo ugotavljali tudi z analizo MALDI-TOF. Iz frakcij smo najprej s pomočjo kolone C18 odstranili soli. Vzorce smo skoncentrirali z vakumskim koncentradorjem. Sledila je priprava matriksa DHAP (2,5-dihidroksi acetofenona) z raztapljanjem 7,6 mg DHAP v 375 µL etanola in 125 µL diamonijevega citrata (18 mg/mL). Vzorcju smo nato dodali 2 % TFA in matriks DHAP v razmerju 1:1:1. En µL te mešanice smo nanесли na ploščo MALDI. Mešanico smo na plošči pustili pri sobni temperaturi do evaporacije. Z masnim spektrometrom MALDI-TOF/TOF UltraFlextreme III (Bruker) smo dobili spekter v rangju 1-20 kDa. Spekter smo kalibrirali s proteinskim standardom I (Bruker).

3.2.5 Primerjava protimikrobnih spektrov *L. gasseri* K7, supernatanta kulture ter izoliranega peptida

Protimikrobno aktivnost seva K7 proti bakterijskim sevom različnih vrst smo testirali s »spot-test«-om na agarju. Za ta test smo 5 µL 18-urne kulture *L. gasseri* K7 točkasto nanесли na površino predhodno osušenega agarja MRS in inkubirali 18 h pri 37 °C. Po inkubiranju smo plošče prelili s 4 mL poltrdega agarja (7,5 g/L agar-agarja), inokuliranega z indikatorskimi bakterijskimi sevi v stacionarni fazi rasti. Za indikatorske seve iz rodu *Lactobacillus* smo uporabili poltrdi agar MRS, za seve iz rodov *Lactococcus* in *Enterococcus* poltrdi agar M17, za seve *Streptococcus*, *Staphylococcus* in *Listeria* poltrdi agar BHI, za seve *Clostridium* pa poltrdi agar RCM. Po 24 urah (za seve iz rodov *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* in *Listeria*) ali 48 urah (za seve iz rodu *Clostridium*) inkubiranja pri 37 °C smo izmerili premer inhibicijskih con.

Filtrirane supernatante kulture *L. gasseri* K7 ali očiščene gasericine tega seva smo preskušali s »spot-test«-om na agarju, kot je opisano zgoraj (3.2.2.3). Za test smo uporabili različne indikatorske seve ter plošče inkubirali 24 ali 48 ur. Izbira poltrdega agarja je bila odvisna od indikatorskega seva. Po končani inkubaciji smo izmerili premer cone inhibicije.

Preglednica 1: Seznam indikatorskih sevov, uporabljenih za ugotavljanje protimikrobnega spektra *L. gasseri* K7 in izoliranega aktivnega peptida gasericina K7 B

Table 1: List of the indicator strains, used for the evaluation of the antimicrobial spectrum of the K7 strain and isolated active peptide of the gassericin K7 B

Indikatorski sev	Zbirka	Gojišče
<i>Lactobacillus helveticus</i> IM30	ATCC 15009	MRS
<i>Lactobacillus gasseri</i> IM243	DSM 20243	MRS
<i>Lactobacillus gasseri</i> IM340	FAM 17828	MRS
<i>Lactobacillus gasseri</i> IM448	CCDM 214	MRS
<i>Lactobacillus sakei</i> IM108	NCDO 2714	MRS
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> IM348	LMG 6901T	MRS
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> IM349	LMG 6412T	MRS
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> IM241	DSM 20069	M17
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> IM245	DSM 20481	M17
<i>Enterococcus faecalis</i> IM272	LMG 7937	BHI
<i>Enterococcus faecium</i> IM273	LMG 11423	BHI
<i>Staphylococcus aureus</i> IM353	ATCC 29213	BHI
<i>Staphylococcus aureus</i> IM132		BHI
<i>Staphylococcus aureus</i> IM317	RN 4220	BHI
<i>Streptococcus thermophilus</i> IM532	LMG 6896	M17
<i>Listeria innocua</i> IM373	LMG 11387	BHI
<i>Clostridium tyrobutiricum</i> IM104	NCDO 1754	RCM
<i>Clostridium tyrobutiricum</i> IM236	FAM 1617	RCM
<i>Clostridium perfringens</i> IM74	5R 875	RCM

Preglednica 2: Seznam kratic, celotno ime ter poreklo različnih zbirk mikroorganizmov

Table 2: List of the abbreviations, full names and the origin of different collections of microorganisms

Kratica	Ime zbirke mikroorganizmov
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, ZDA
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, Nemčija
FAM	Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft; Federal dairy research station, Liebefeld, Švica
LMG	Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (UGent), L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgija
NCDO	National Collection of Dairy Organisms, National Institute for Dairying, Reading, Anglija
CCM/CCDM	Czech Collection of Microorganisms, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Češka
IM	Chair of Dairy Science, University of Ljubljana, Domžale, Slovenija
UT	S. Vesterlund, University of Turku, Finska
UU	W. Gastra, University of Utrecht, Nizozemska

3.2.6 Proučevanje vpliva seva *Lactobacillus gasseri* K7 in izoliranega peptida AcP na epiteljske celice in tesne stike na celičnem modelu Caco-2

3.2.6.1 Gojenje celic Caco-2

Celično linijo smo pridobili iz ameriške zbirke tipskih kultur (American Type Culture Collection; ATCC), v kateri je deponirana pod oznako ATCC HTB 37. Celice Caco-2 smo gojili v gojišču DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) z dodatki. Osnovno gojišče DMEM smo pripravili po navodilih proizvajalca (Sigma-Aldrich). Dodali smo sterilno pripravljen serum govejega zarodka (FBS) do končne koncentracije 10 % in antibiotik gentamicin do končne koncentracije 0,1 % založne raztopine.

Celice smo presajali 1-krat tedensko. Za poskus smo uporabili celice med 31. in 35. pasažo. Za odlepljanje celic od podlage smo jih najprej sprali s fosfatnim pufrom, nato pa medcelične povezave prekinili z 0,125 % tripsin-EDTA. Celice smo prekrili z raztopino tripsin-EDTA, jo po 1 minuti odstranili in nato inkubirali še 10 minut. Celice smo nato resuspendirali v gojišču DMEM in jih prešteli s hemocitometrom. Za

namnoževanje celic smo v gojitvene posode površine 75 cm² nasadili po 2×10⁶ celic. Gojišče smo menjali na vsake 2-3 dni. Za merjenje TEER ter imunooznačevanje smo celice nasadili na plošče z 12- ter 24-imi jamicami, ki so vsebovale vstavke z membranami s površino 1,12 cm² in 0,33 cm². Nasaditvena gostota celic na ploščah z 12-imi jamicami z membranami je bila 7×10⁴ celic/jamico, na ploščah s 24-imi jamicami pa 2×10⁴ celic/jamico. Celice smo gojili 21 dni od nasaditve celic na membrane. Gojišče smo menjali na vsake 2-3 dni. Najprej smo odsesali gojišče na apikalni strani in nato še ne bazolateralni strani, sprali s svežim gojiščem in dodali v jamice plošč z 12-imi jamicami 1,5 mL gojišča na bazolateralni strani ter 500 µL na apikalni strani, oziroma 600 µL na bazolateralni strani in 100 µL na apikalni strani, če so imele plošče 24 jamic (Hacin, 2010; Matijašić in sod., 2006).

3.2.6.2 Priprava celic za merjenje TEER in imunooznačevanje za konfokalno mikroskopiranje

Vsaj 24 ur pred poskusom smo celicam zamenjali osnovno gojišče z gojiščem brez antibiotika. Na dan poskusa (t₀) smo izmerili TEER. V gojišče smo dodali pripravljene bakterijske seve, bakteriocine, PDB ali kombinacijo le-teh in nanесли na apikalno stran membrane (glej poglavje 3.2.5.3), medtem ko smo na bazolateralno stran dodali gojišče brez antibiotika. Vsako koncentracijo bakterijskih celic, bakteriocinov, PDB ali kombinacije le-teh smo nanašali na ploščo v 2 ali 3 paralelkah. Poskus smo ponovili vsaj 3-krat.

3.2.6.3 Priprava sevov, aktivne komponente Gas K7 B in PDB

Preiskovana bakterijska seva *L. gasseri* K7 in *L. plantarum* WCFS1 smo 18 ur gojili v bujonu MRS pri 37 °C. Po 18 h inkubacije smo kulturo centrifugirali in pelet trikrat sprali s fosfatnim pufrom (PBS). Po tretjem spiranju smo bakterije resuspendirali v fosfatnem pufru in uravnali število celic z umerjanjem optične gostote pri 600 nm, tako da smo dobili 3 različne koncentracije bakterijskih celic: 1-2×10⁶, 1-2×10⁷ ter 1-2×10⁸ KE/vstavke z membrano. Za poskus smo pripravili tri koncentracije aktivne komponente Gas K7 B: 2,5 µg/mL, 5 µg/mL in 10 µg/mL. Testirali smo 3 različne

koncentracije PDB: 5 μM , 25 μM in 50 μM . Na podlagi rezultatov smo v preskusih za porušenje tesnih stikov uporabili koncentracijo 25 μM .

3.2.6.4 Merjenje transepitelijske električne upornosti na celičnem modelu Caco-2

Transepitelijsko električno upornost (TEER) celic Caco-2 smo merili vsakih 1,5 h. Pred merjenjem smo plošče pustili 15 min na sobni temperaturi, da se je TEER stabilizirala. TEER monosloja, ki so ga tvorile celice Caco-2, smo merili z epitelijskim voltmetrom (Millicell ERS-2, Millipore) in s pripadajočim parom elektrod. Epitelijski voltmeter s parom kombiniranih elektrod se uporablja za merjenje toka in upornosti pri epitelijskih kulturah, nasajenih na porozne membrane, s površino 0,33 cm^2 za plošče s 24-imi jamicami in 1,12 cm^2 za plošče z 12-imi jamicami. Transepitelijsko upornost merimo tako, da elektrodi potopimo v gojišče ob porozni membrani in nad njo. Postopek izvedemo tako, da se daljša elektroda dotika dna luknje, krajšo elektrodo pa potopimo v gojišče tik nad porozno membrano, preraščeno z epitelijskimi celičnimi kulturami. Pomembno je, da sta elektrodi ob merjenju postavljeni pravokotno na porozno membrano. K izmerjeni transepitelijski upornosti prispevata, poleg dejanske TEER celic, tudi upornost porozne membrane in upornost gojišča. Da smo dobili dejansko TEER celične kulture Caco-2, smo izmerili TEER porozne membrane v gojišču brez celic ter jo odšteli od izmerjenih vrednosti TEER. Upornost poroznih membran brez celic je znašala na ploščah z 12-imi jamicami 108 $\Omega \times \text{cm}^2$, na ploščah s 24-imi jamicami pa 178 $\Omega \times \text{cm}^2$. Dobljen rezultat smo pomnožili s površino membrane, torej za plošče z 12-imi jamicami s površino 1,12 cm^2 in za plošče s 24-imi jamicami s površino 0,33 cm^2 .

3.2.6.5 Imunooznačevanje proteinov tesnih stikov

Za imunooznačevanje smo celicam, nasajenim na membranah plošč z 12-imi jamicami, odstranili gojišče ter jih 3-krat sprali s PBS. Sledila je fiksacija celic s 4 % raztopino paraformaldehida v PBS 10 min pri sobni temperaturi. Po fiksaciji smo jih ponovno spirali s PBS 3 do 5-krat ter nato permeabilizirali membrano celic z raztopino 0,1 % Tritona X-100 (15 min, 2-8 °C). Po inkubaciji smo membrane s fiksiranimi in permeabiliziranimi membranami celic ponovno spirali s PBS 3 do 5-krat ter dodali 1 %

BSA ter inkubirali 1h v inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂). Zatem smo jih ponovno sprali s PBS ter dodali primarna protitelesa proti beljakovini ZO-1 (Zonula occludens-1 - ZO-1 Polyclonal Ab, rabbit, 3 µg/mL, 617300, Molecular Probes) in jih inkubirali 1 h pri sobni temperaturi. Po inkubaciji s primarnimi protitelesi smo celice Caco-2 ponovno sprali s PBS in jim dodali mešanico primarnih mišjih monoklonska protiteles, konjugiranih z Alexa Fluor 488 za označevanje okcludin in sekundarnih protiteles proti primarnim za ZO-1 (Alexa Fluor[®] 594 Goat Anti-rabbit IgG, 5 µg/mL, A11037, Molecular Probes). Naslednji dan smo membrane s fiksiranimi celicami dobro sprali, jih izrezali s skalpelom ter jih prenesli na objektna stekelca. Na izrezane mebrane smo nanесли kapljico reagenta s fluorescenčnim barvilom DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), jih pokrili s krovnim stekelcem, obtežili ter v temi inkubirali pri sobni temperaturi čez noč. Do mikroskopiranja smo preparate hranili pri 2-8 °C v temi. Preparate smo pregledali s konfokalnim mikroskopom na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

3.2.6.6 Merjenje IL-8, izločenega v gojišče med gojenjem celic Caco-2 na apikalni in bazolateralni strani

V začetnih preskusih smo določili najprimernejšo koncentracijo celic *L. gasseri* K7 in čas, pri katerem je bila TEER ob inkubiranju v Caco-2 v prisotnosti seva K7 največja. Na tej časovni točki smo vzorčili gojišče tako apikalno kot tudi bazolateralno. Prav tako smo določili koncentracijo seva in čas, pri katerih sev statistično značilno zmanjša padec TEER, povzročen s PDB. Tudi na tej točki smo vzorčili gojišče na apikalni in bazolateralni strani membran. Koncentracijo citokina IL-8 smo izmerili s kompletom reagentov »Human IL-8/NAP-1 Module Set« po navodilih proizvajalca (glej poglavje 3.3.6.5).

3.2.7 Proučevanje imunomodulatornega vpliva izoliranega peptida AcP na celičnem modelu THP-1

3.2.7.1 Gojenje celične linije THP-1

Celično linijo THP-1 smo pridobili iz ameriške zbirke tipskih kultur (American Type Culture Collection; ATCC), v kateri je deponirana pod številko ATCC TIB-202. Celice THP-1 smo gojili s pomočjo standardnih tehnik za celične kulture v gojišču RPMI 1640 z dodatki, v inkubatorju pri 37 °C, v anaerobnih razmerah s 5 % CO₂. Že pripravljenemu gojišču (500 mL) smo dodali 5,5 mL 200 mM L-glutamina, 2 mL mešanice streptomicina in penicilina, ki je vsebovala 5000 U/mL streptomicina in 5000 µg/mL penicilina, 50 mL deaktiviranega telečjega seruma in 1,748 µL 14,3 M 2-merkaptetoetanol.

Za gojenje celic smo uporabljali polistirenske platenke s površino 75 cm², v katerih so bile celice resuspendirane v gojišču in se niso pritrdile na podlago. Ko so se monociti pričeli deliti in tvoriti skupke v obliki grozdov, smo jih centrifugirali 5 min pri 1600 g in 4 °C, prešteli in resuspendirali v 20 mL gojišča RPMI 1640, tako da je bila njihova končna koncentracija med 5×10^5 in 7×10^5 celic/mL. Celice smo ponovno inkubirali, dokler nismo pridobili zadostnega števila celic za izvedbo poskusa. Gojišče smo menjali v povprečju 3-krat tedensko. Celice smo šteli tako, da smo 100 µL celic, resuspendiranih v RPMI, odpipetirali v mikroepreveto, ki je vsebovala 900 µL tripanskega modrila, 100 µL te suspenzije odpipetirali v Neubauerjevo komoro in celice, ki so se obarvale modro (žive celice z ohranjeno celično membrano) prešteli s pomočjo svetlobnega mikroskopa.

3.2.7.2 Priprava celic THP-1 za poskus ter vzorčenje supernatantov

Vsaj 24 ur pred začetkom poskusa smo celice gojili v gojišču RPMI, ki ni vsebovalo antibiotika. Pred poskusom smo celice prešteli, resuspendirali v gojišču RPMI 1640 in jih v koncentraciji 1×10^6 celic/mL odpipetirali v polistirenske plošče s 24 jamicami, tako da je vsaka jamica vsebovala 1×10^6 celic. Gojišču RPMI smo dodali forbolni ester PMA (12-tetradekanoilforbol-13-acetat) v koncentraciji 10 ng/mL in plošče inkubirali 24 ur v CO₂ inkubatorju pri 37 °C s 5 % CO₂. Pod vplivom PMA so se monociti celične linije THP-1 diferencirali v makrofage in se pritrdili na dno polistirenske plošče.

Pritrjene celice smo sprali z gojiščem RPMI brez PMA in antibiotikov in ponovno inkubirali 24 ur v CO₂ inkubatorju pri 37 °C s 5 % CO₂. V poskusih smo uporabili celice med 8. in 12. pasažo.

3.2.7.3 Priprava mikroorganizmov za poskus

V testu smo uporabili sev *L. gasseri* K7. 18-urno kulturo laktobacilov, ki je bila pred tem 2-krat precepljena, smo centrifugirali in trikrat sprali s fosfatnim pufrom. Po tretjem spiranju smo bakterije resuspendirali v fosfatnem pufru in uravnali število celic z umerjanjem optične gostote na 0,5 pri 650 nm, pri čemer smo dobili približno 1×10^8 KE/mL. Pred poskusom smo suspenzijo laktobacilov v fosfatnem pufru ponovno centrifugirali in celice resuspendirali v istem volumnu gojišča RPMI.

3.2.7.4 Potek poskusa

V tri zaporedne jamice z diferenciranimi celicami THP-1 smo odpipetirali po 1 mL:

- gojišča RPMI
- RPMI z dodanimi lipopolisaharidi (LPS) *E. coli* (O111:B4) v končni koncentraciji 0,4 µg/mL
- v RPMI resuspendiranega seva *Lactobacillus gasseri* K7 v koncentraciji 10^8 KE/mL z dodanimi lipopolisaharidi (LPS) *E. coli* (O111:B4) v končni koncentraciji 0,4 µg/mL
- RPMI z dodano aktivno komponento gasicina K7 B (10 µg/mL)
- RPMI z dodanimi lipopolisaharidi (LPS) *E. coli* (O111:B4) v končni koncentraciji 0,4 µg/mL ter dodano aktivno komponento gasicina K7 B (10 µg/mL).

V jamice plošče smo odpipetirali gojišče z dodanimi zgoraj navedenimi kombinacijami. Tako pripravljeno ploščo smo inkubirali 6 ur v CO₂ inkubatorju pri 37 °C. Po 6-urni inkubaciji smo odpipetirali supernatante celične linije THP-1 in jih do opravljanja meritev koncentracije različnih provnetnih citokinov hranili pri -80 °C.

3.2.7.5 Vrednotenje provnetnih citokinov z metodo »sendvič« ELISA

Z metodo »sendvič« ELISA smo izmerili koncentracijo izločenih provnetnih citokinov v gojišču.

3.2.7.5.1 Merjenje vsebnosti izločenih provnetnih citokinov s komercialnimi kompleti reagentov

Koncentracijo citokinov, ki jih celice THP-1 izločajo v gojišče po izpostavitvi bakterijam ali peptidom, smo merili v supernatantih, vzorčenih pri poskusu ter shranjenih pri -80°C. Uporabili smo metodo »sendvič« ELISA, z uporabo komercialno dostopnih kompletov reagentov:

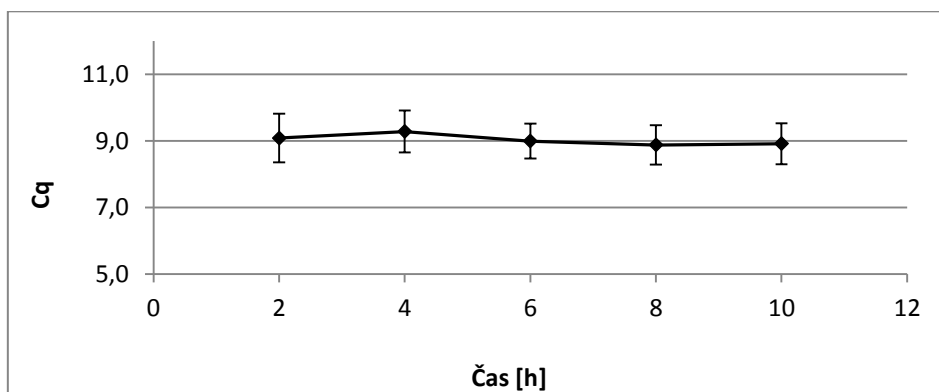
- IL-1 β (eBioscience, 88-7010-88)
- Human IL-6 Module Set (eBioscience, BMS213/2MST)
- Human IL-8/NAP-1 Module Set (eBioscience, BMS204/3MST)
- Human TNF- α total Module Set (eBioscience, BMS2034MST).

Vsakega od zgoraj naštetih citokinov smo analizirali po navodilih proizvajalca. V splošnem pa smo test ELISA izvedli po naslednjem postopku. Uporabili smo mikrotiterske plošče s 96 jamicami (Nunc MaxiSorp). Najprej smo plošče prekrili z lovilnimi protitelesi (100 μ L/jamico) in inkubirali preko noči pri 4 °C. Po inkubaciji smo plošče sprali 3 do 4-krat s pufrom za spiranje, s spiralcem mikrotiterskih plošč (Bio-Tek ELx50). Prosta mesta v jamicah smo blokirali z blokirnim pufrom 2 uri pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo ponovno spirali 3 do 4-krat s po 300 μ L pufra za spiranje/jamico. Nato smo v jamice prenesli redčine standarda, vzorce ter kontrole (vse v 2 ponovitvah, 100 μ L) ter dodali detekcijska protitelesa (50 μ L) ter inkubirali 2 uri na sobni temperaturi. Sledilo je spiranje, kot je opisano zgoraj. Zatam smo v jamice nanесли streptavidin-HRP (iz angl.: horse radish peroxidase), inkubirali 30 min ter nato ponovno spirali. Sledil je dodatek substrata TMB ter inkubacija 30 minut v temi. Reakcijo smo ustavili z dodatkom raztopine (Stop solution) za ustavitev barvne reakcije in v roku 10 min izmerili optično gostoto pri valovni dolžini 450 nm s čitalcem mikrotiterskih plošč (Bio-Tek ELx808).

4 REZULTATI

4.1 IZRAŽANJE GENOV ZA GASERICINA K7 A IN K7 B TER PROTIMIKROBNA AKTIVNOST SEVA *L. gasseri* K7

Z metodo RT-qPCR smo ovrednotili izražanje genov za gasericina K7 A in K7 B med rastjo seva K7 v tekočem gojišču MRS. Raziskava genoma seva K7 je pokazala, da 1143 bp velika regija za gasericin K7 A vsebuje 3 bralne okvirje (*orf*), ki nosijo zapis za aktivni peptid, za komplementarni peptid in za peptid za imunost. Večja regija (3276 bp) za gasericin K7 B vsebuje 6 *orf*, ki nosijo zapise za naslednje peptide: transportni peptid, akcesorni peptid, hipotetični peptid, komplementarni peptid, aktivni peptid ter peptid za imunost. Za vsak gen so bili skonstruirani začetni oligonukleotidi (izjema je hipotetični peptid), ki smo jih uporabili za RT-qPCR na vzorcih, pridobljenih vsaki 2 h med 10 h rastjo seva v tekočem gojišču MRS. Kot referenčni gen smo uporabili gen za 16S rRNA. Izražanje tega gena smo prav tako spremljali med inkubacijo seva K7 v tekočem gojišču MRS. Rezultati so pokazali, da med 10 h inkubacijo ni prišlo do značilnih razlik v izražanju gena za 16S rRNA (slika 4).



Slika 4: Izražanje referenčnega gena za 16S rRNA med 10 h inkubacijo seva *L. gasseri* K7 v tekočem gojišču MRS

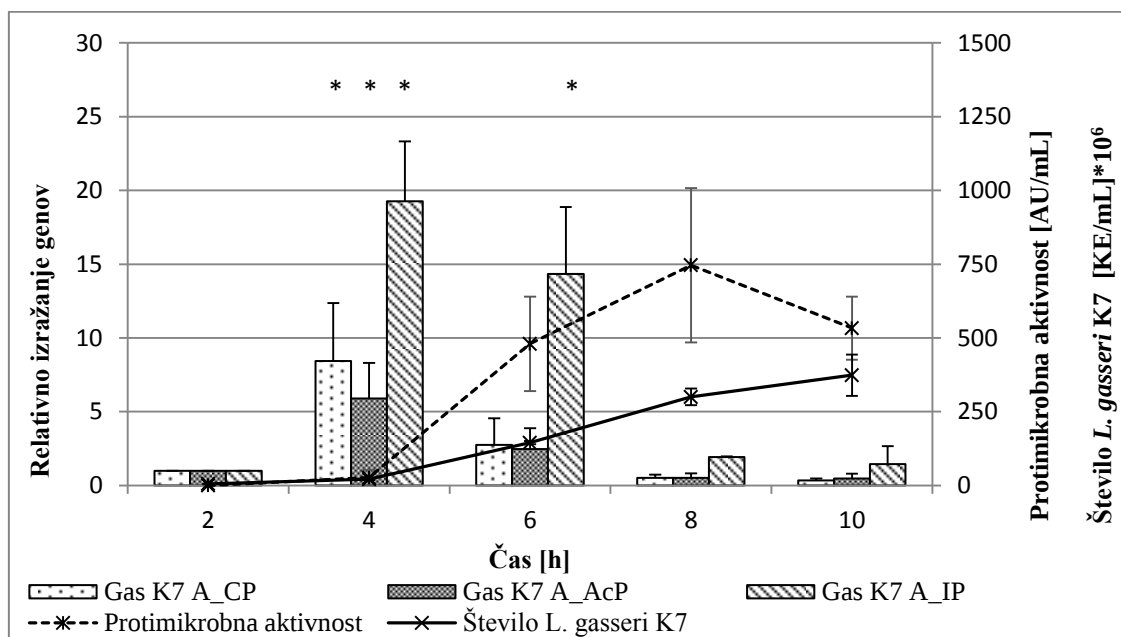
Prikazane so povprečne vrednosti 3 bioloških ponovitev, pri čemer je bila vsaka izvedena v dveh tehničnih ponovitvah, ter standardni odkloni.

Figure 4: Expression of the reference gene 16S rRNA during *Lactobacillus gasseri* K7 strain growth in MRS broth culture

Data shown as bars are mean values of three biological repetitions, with two technical replicates for each, and standard deviations.

Med 10 h inkubacijo seva K7 v tekočem gojišču MRS smo v supernatantu kulture prvič zasledili protimikrobno aktivnost po 4 h inkubacije. V tem času je bila kultura v eksponentni fazi rasti, koncentracija bakterijskih celic seva pa $2,0 \times 10^7$ KE/mL. Protimikrobna aktivnost je dosegla maksimum po 8 h inkubacije, ko je koncentracija bakterij presegla 10^8 KE/mL (**slika 5 in 6**).

Izražanje treh genov (Gas K7 A_CP – komplementarni peptid, Gas K7 A_AcP – aktivni peptid, Gas K7 A_IP – peptid za imunost) za gasericin K7 A (**slika 5**) in 5-ih genov (Gas K7 B_TP – transportni peptid, Gas K7 B_AP – akcesorni peptid, Gas K7 B_CP – komplementarni peptid, Gas K7 B_AcP – aktivni peptid, Gas K7 A_IP – peptid za imunost) za gasericin K7 B (**slika 6**) je doseglo maksimum po 4 h inkubacije seva K7 v tekočem gojišču MRS. Po 6 urah inkubacije seva smo zaznali upad izražanja vseh genov, vendar sta bila še vedno statistično značilno izražena gena za Gas K7 A_IP in Gas K7 B_CP. Po 8 h rasti seva K7 nismo zasledili statistično značilno povečanega izražanja pri nobenem od proučevanih genov.

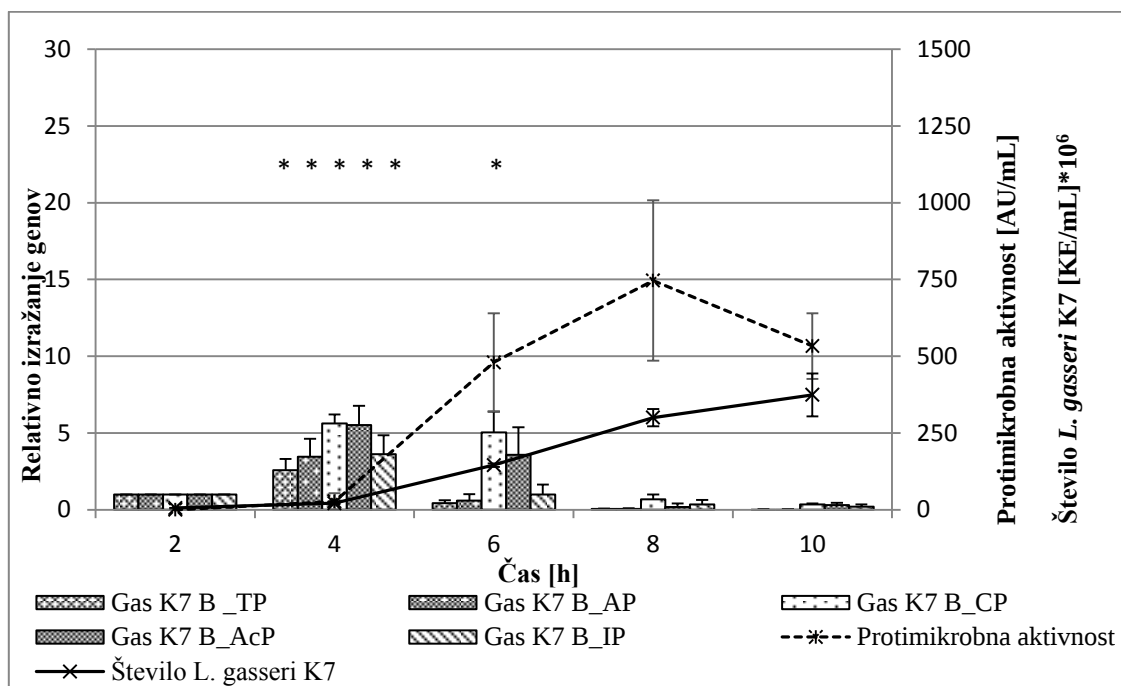


Slika 5: Relativne vrednosti izražanja genov za gaseiricin K7 A med 10 h inkubacijo seva *Lactobacillus gasseri* K7 v tekočem gojišču MRS

Tarčni geni: Gas K7 A_CP – gen za komplementarni peptid gaseiricina K7 A, Gas K7 A_AcP – gen za aktivni peptid gaseiricina K7 A, Gas K7 A_IP – gen za peptid imunosti gaseiricina K7 A; Za vsako vrednost je prikazan standardni odklon. Zvezdica (*) označuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) med relativnim izražanjem genov gaseiricina K7 A seva *L. gasseri* K7, inkubiranega 2 h in relativnim izražanjem istih genov po 4, 6, 8 in 10 h inkubacije seva K7 v tekočem gojišču MRS.

Figure 5: Relative expression levels of gaseiricin K7 A genes during 10 h incubation of *Lactobacillus gasseri* K7 in MRS broth

Target genes: Gas K7 A_CP – gaseiricin K7 A complementary peptide, Gas K7 A_AcP - gaseiricin K7 A active peptide, Gas K7 A_IP – gaseiricin K7 A immunity peptide; Data shown as bars are mean values with standard deviations. Asterisk (*) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) between relative expression of gaseiricin K7 A genes of *L. gasseri* K7 strain incubated 2 h and expression of genes after 4, 6, 8 and 10 h of K7 strain incubation in MRS broth.



Slika 6: Relativne vrednosti izražanja genov za gasericin K7 B med 10 h inkubacijo seva *L. gasseri* K7 v tekočem gojišču MRS

Tarčni geni: Gas K7 B_TP – gen za transportni peptid gasericina K7 B, Gas K7 B_AP – gen za akcesorni peptid gasericina K7 B, Gas K7 B_CP – gen za komplementarni peptid gasericina K7 B, Gas K7 B_AcP – gen za aktivni peptid gasericina K7 B, Gas K7 A_IP – gen za peptid imunosti gasericina K7 B. Za vsako vrednost je prikazan standardni odklon. Zvezdica (*) označuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) med relativnim izražanjem genov gasericina K7 B seva *L. gasseri* K7, inkubiranega 2 h in relativnim izražanjem istih genov po 4, 6, 8 in 10 h inkubaciji seva K7 v tekočem gojišču MRS.

Figure 6: Relative expression levels of gassericin K7 B genes during 10 h incubation of *Lactobacillus gasseri* K7 in MRS broth

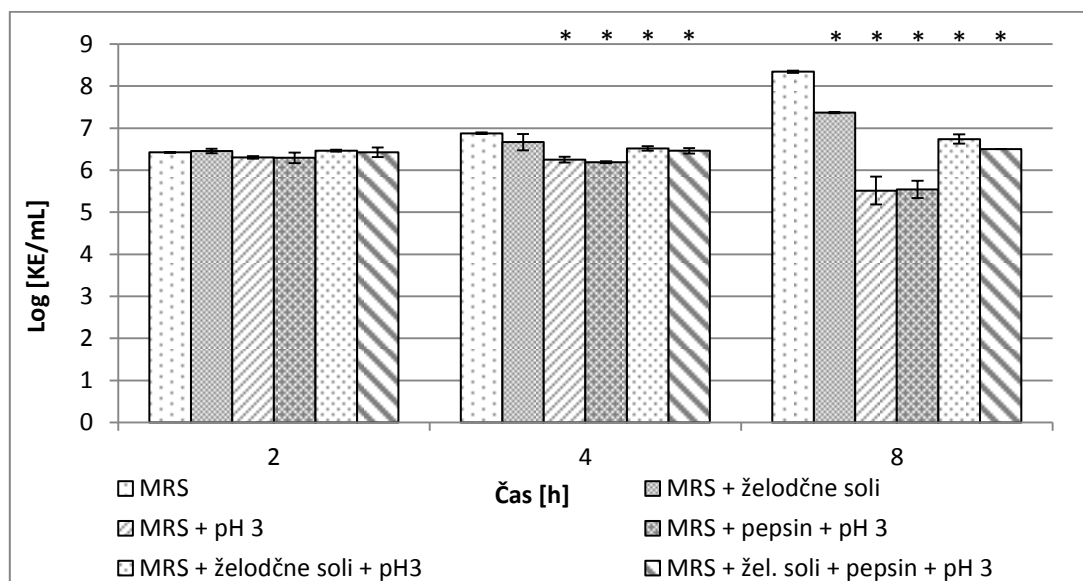
Target genes: Gas K7 B_TP – gene for gassericin K7 B transport peptide, Gas K7 B_AP – gene for gassericin K7 B accessory peptide, Gas K7 B_CP – gene for gassericin K7 B complementary peptide, Gas K7 B_AcP – gene for gassericin K7 B active peptide, Gas K7 B_IP – gene for gassericin K7 B immunity peptide; Data shown as bars are mean values with standard deviations. Asterisk (*) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) between relative expression of gassericin K7 B genes of *L. gasseri* K7 strain incubated 2 h and expression of genes after 4, 6, 8 and 10 h of K7 strain incubation in MRS broth.

4.2 VPLIV DEJAVNIKOV, ZNAČILNIH ZA PREBAVNI TRAKT ČLOVEKA, NA PREŽIVETJE IN PROTIMIKROBNO AKTIVNOST *L. gasseri* K7

Spremljali smo preživetje *L. gasseri* K7 v tekočem gojišču MRS, ki je bilo modificirano z različnimi dejavniki, značilnimi za okolje želodca (pH=3, soli, pepsin) oziroma črevesa (pH=8, žolčne soli, pankreatin).

4.2.1 Vpliv dejavnikov, značilnih za želodec, na preživetje in protimikrobno aktivnost *L. gasseri* K7

Med pomembnejšimi dejavniki, ki so prisotni v želodcu in ki vplivajo na preživetje in protimikrobno aktivnost mikroorganizmov, so kislo okolje (pH=1,5 do 3), soli in encim pepsin. Značilen negativen vpliv posameznih dejavnikov, oziroma njihove kombinacije, smo opazili že po 4 urah inkubacije. Največje razlike pa so se pokazale po 8 h gojenja seva v različnih gojiščih. Na preživetje je najbolj vplivala nizka vrednost pH 3, pri katerem se je število KE/mL zmanjšalo za približno 0,8 logaritemske enote, medtem ko se je v samem gojišču MRS povečalo za približno 2 log enoti. Preživetje seva je bilo pri pH 3 boljše, če so bile gojišču dodane soli v koncentracijah, običajnih v želodčnem soku (**slika 7**). Dodatek pepsina ni negativno vplival na preživetje. Protimikrobno aktivnost smo zasledili samo v gojišču MRS ter v gojišču MRS z dodanimi solmi. V gojiščih s pH 3, z ali brez dodatkov soli ali pepsina, protimikrobne aktivnosti nismo zaznali (**preglednica 3**).



Slika 7: Preživetje *L. gasseri* K7, izraženo kot log [KE/mL], v gojišču MRS, modificiranim z dejavniki, značilnimi za okolje želodca (pH=3, soli, pepsin)

Za vsako vrednost je prikazan standardni odklon. Zvezdica (*) prikazuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) med log [KE/mL] v tekočem gojišču MRS ter log [KE/mL] seva K7 v posameznih modificiranih gojiščih.

Figure 7: *L. gasseri* K7 survival expressed as log [CFU/mL] in the MRS broth modified by factors specific to the gastric environment (pH=3, salts, pepsin)

Data shown as bars are mean values with standard deviations. Asterisk (*) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) between log [CFU/mL] in MRS broth and log [CFU/mL] of K7 strain in modified MRS broths.

Preglednica 3: Protimikrobna aktivnost (AU/mL) v supernatantih kulture *L. gasseri* K7, inkubiranih 8 h v gojišču MRS, modificiranim z dejavniki, ki so značilni za okolje želodca

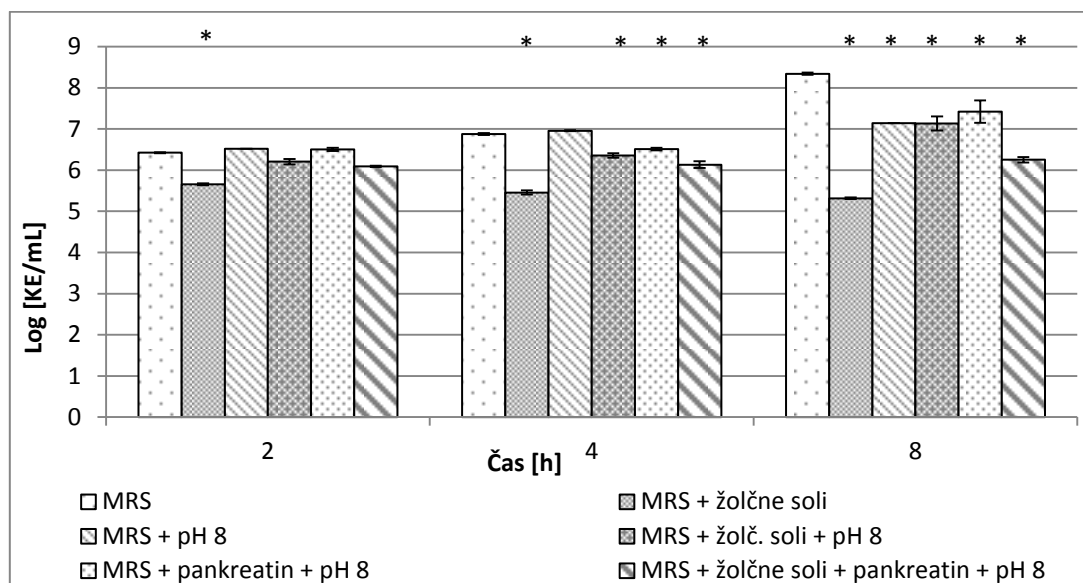
Table 3: Antimicrobial activity (AU/mL) in supernatants of the *L. gasseri* K7 culture, incubated 8 h in MRS broth, modified by factors specific to the gastric environment

Čas [h]	MRS [AU/mL]	MRS + soli [AU/mL]	MRS + pH=3 [AU/mL]	MRS + pH=3 + pepsin [AU/mL]	MRS + soli + pH=3 [AU/mL]	MRS + soli + pepsin + pH=3 [AU/mL]
2	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
8	2560	1280	0	0	0	0

4.2.2 Vpliv dejavnikov, značilnih za črevesje, na preživetje in protimikrobno aktivnost seva *L. gasseri* K7

Med pomembnejšimi dejavniki, ki so prisotni v črevesju in vplivajo na preživetje mikroorganizmov, so alkalni pH, encim pankreatin ter žolčne soli. Največja razlika pri preživetju in protimikrobni aktivnosti se je pokazala po 8 h inkubiranja seva v prisotnosti omenjenih dejavnikov, oziroma kombinaciji le-teh.

V gojiščih, v katerih so bile dodane žolčne soli, protimikrobne aktivnosti nismo ugotovili (**preglednica 4**). V gojišču MRS s povišano vrednostjo pH (pH 8) je bila protimikrobna aktivnost enaka kot pri samem tekočem gojišču MRS (pH 6,5), prav tako smo jo zaznali že po dveh urah inkubiranja. V gojišču z dodanim pankreatinom je bilo protimikrobne aktivnosti v supernatantu manj, in sicer 160 AU/mL (**slika 8**).



Slika 8: Preživetje *L. gasseri* K7, izraženo kot log [KE/mL], v gojišču MRS, modificiranim z dejavniki, značilnimi za črevesje (pH=8, žolčne soli, pankreatin)

Za vsako vrednost je prikazan standardni odklon. Zvezdica (*) označuje statistično značilna razlika ($p < 0,05$) med log [KE/mL] v tekočem gojišču MRS ter log [KE/mL] v posameznih modificiranih gojiščih.

Figure 8: *L. gasseri* K7 survival expressed as log [CFU/mL] in the MRS broth modified by factors specific to the intestinal environment (pH=8, bile salts, pancreatin)

Data shown as bars are mean values with standard deviations. Asterisk (*) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) between log [CFU/mL] in MRS broth and log [CFU/mL] in modified MRS broths.

Preglednica 4: Protimikrobna aktivnost (AU/mL) v supernatantih kultur *L. gasseri* K7, inkubiranih 8 h v gojišču MRS, modificiranim z dejavniki, ki so značilni za okolje črevesa

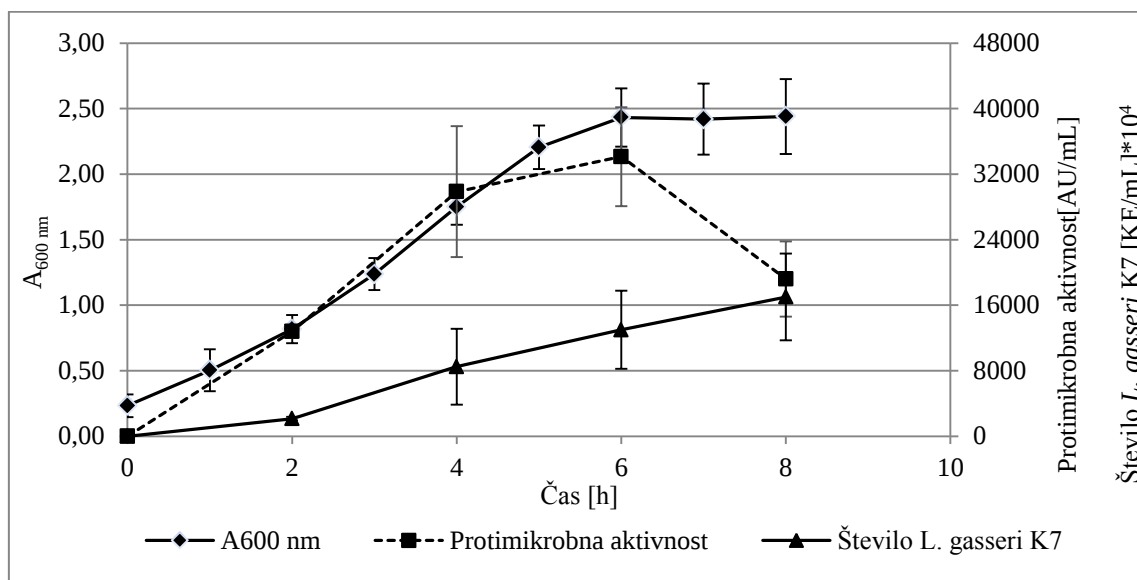
Table 4: Antimicrobial activity (AU/mL) in supernatants of the *L. gasseri* K7 culture, incubated 8 h in MRS broth, modified by factors specific to the intestinal environment

Čas [h]	MRS [AU/mL]	MRS + pH=8 [AU/mL]	MRS + žolčne soli [AU/mL]	MRS + pH=8 + žolčne soli [AU/mL]	MRS + pankreatin [AU/mL]	MRS + soli + pankreatin + pH=8 [AU/mL]
2	0	80	0	0	0	0
4	0	1280	0	0	0	0
8	1280	1280	0	0	160	0

4.3 PRODUKCIJA BAKTERIOGINOV MED GOJENJEM SEVA *L. gasseri* K7 V BIOREAKTORJU

V sestavljenem gojišču mMRS smo sev K7 gojili 8 h, z uravnavanjem vrednosti pH (5,75), temperature (37 °C) in z mešanjem (350 obr./min). Po 8 urah smo proces ustavili. Kulturo smo sterilno vzorčili vsaki 2 uri ter vzorce uporabili za testiranje protimikrobne aktivnosti ter rasti.

Mikrobna populacija seva K7 je dosegla eksponentno fazo že po 2 urah rasti v bioreaktorju. Največjo protimikrobno aktivnost v supernatantu kulture smo ugotovili po 6 h fermentacije ($3,4 \times 10^4$ AU/mL), medtem ko je v nadaljnjih dveh urah padla pod 2×10^4 AU/mL. Koncentracija bakterij je v 6-ih urah narasla na 10^8 KE/mL ter se pri tej vrednosti ustalila. Gostota biomase ($A_{600\text{nm}}$) je enakomerno naraščala vse do konca inkubacije ter se ustalila pri vrednosti približno 2,4 (slika 9).



Slika 9: Rast in protimikrobna aktivnost v supernatantu kulture med 8 h gojenjem seva *L. gasseri* K7 v bioreaktorju (pH=5,75, T=37 °C in z mešanjem 350 obr./min)

Za vsako vrednost je prikazan standardni odklon.

Figure 9: *Lactobacillus gasseri* K7 growth and antimicrobial production during 8 h of incubation in a bioreactor (pH=5.75, T=37 °C, 350 rpm/min)

Data shown as bars are mean values with standard deviations.

4.3.1 Čiščenje bakteriocinov

Po izsoljevanju proteinov iz supernatanta z amonijevim sulfatom smo v vzorcu izmerili specifično protimikrobno aktivnost $1,2 \times 10^5$ AU/mg (**preglednica 5**). Izplen celokupne protimikrobne aktivnosti je bil na tej stopnji čiščenja 42 %. Ločevanje izsoljenih proteinov je potekalo na kolonah SPE s postopnim večanjem koncentracije acetonitrila (5, 10, 20, 40 %), čemur je sledilo končno spiranje kolon s 100 % 2-propanolom. Največjo specifično aktivnost je imela frakcija, sprana s kolone s 40 % acetonitrilom ($1,4 \times 10^5$ AU/mg) (**preglednica 6**).

Po spiranju s 40 % acetonitrilom na SPE se je celokupna protimikrobna aktivnost znižala na 1 %, specifična aktivnost pa je dosegla $1,4 \times 10^5$ AU/mg. Frakcija po spiranju s 40 % acetonitrilom je bila injicirana na preparativno kolono RP-HPLC. V **preglednici 7** je prikazana specifična aktivnost frakcij, ločenih na preparativni koloni RP-HPLC. Največjo specifično aktivnost je dosegla frakcija F₃ ($5,1 \times 10^5$ AU/mg), ki smo jo analizirali z metodo masne spektrometrije.

Protimikrobno aktivnost so izkazovale frakcije, zbrane med ločevanjem na preparativni koloni RP-HPLC med 56. in 61. minuto. **Slika 10** prikazuje kromatogram ločevanja frakcij, predhodno pridobljenih na koloni SPE s spiranjem s 40 % acetonitrilom, na preparativni koloni RP-HPLC. Povečana slika v zgornjem levem kotu prikazuje področje petih frakcij z največjo specifično protimikrobno aktivnostjo. Največjo specifično aktivnost smo ugotovili v frakciji F₃ ($5,1 \times 10^5$ AU/mg; **preglednica 7**).

Preglednica 5: Izplen protimikrobne aktivnosti med postopkom čiščenja bakteriocinov iz supernatanta kulture *L. gasseri* K7 z izsoljevanjem z amonijevim sulfatom, SPE ter RP-HPLC

Table 5: Yield of antimicrobial activity during isolation steps including ammonium sulphate precipitation, SPE and RP-HPLC from supernatant of *L.gasseri* K7 strain culture

Stopnja čiščenja	V [mL]	Aktivnost [AU/mL]	C _{proteinov} [mg/mL]	Specif. aktivnost [AU/mg]	Skupna c _{proteinov} [mg]	Skupna aktivnost [AU]	Izkoristek [%]
Supernatant	600	$2,6 \times 10^4$	0,5	$6,0 \times 10^4$	270	$1,5 \times 10^7$	100
Izoljevanje (amonijev sulfat)	30	$2,1 \times 10^5$	1,7	$1,2 \times 10^5$	51,6	$6,3 \times 10^6$	42
SPE 40% acetonitril	6	$2,6 \times 10^4$	0,2	$1,4 \times 10^5$	1,08	$1,5 \times 10^5$	1
RP-HPLC frakcija F3	0,5	$2,6 \times 10^4$	0,05	$5,2 \times 10^5$	0,03	$1,3 \times 10^4$	0,09

Preglednica 6: Specifična protimikrobna aktivnost [AU/mg] frakcij, pridobljenih po spiranju vzorca s precipitiranimi proteini iz supernatanta kulture *L. gasseri* K7 na kolonah SPE s postopnim višanjem % acetonitrila in 2-propanola

Frakcijo z najvišjo specifično aktivnostjo (osencena s sivo barvo) smo uporabili v nadaljnjih korakih čiščenja gasericinov.

Table 6: Specific antimicrobial activity [AU/mg] of SPE fractions obtained by stepwise elution of *L. gasseri* K7 culture supernatant salted-out proteins with acetonitrile and 2-propanol

SPE fraction with the highest specific activity (labelled grey) was selected for further purification steps.

SPE frakcije	Aktivnost [AU/mL]	C _{proteinov} [mg/mL]	Aktivnost/C [AU/mg]
5% acetonitrile	$3,2 \times 10^3$	0,2	$3,2 \times 10^4$
10% acetonitrile	$4,0 \times 10^2$	0,01	$3,1 \times 10^4$
20% acetonitrile	0	0,01	0
40% acetonitrile	$2,6 \times 10^4$	0,2	$1,4 \times 10^5$
100% 2-propanol	$1,6 \times 10^3$	0,3	$4,7 \times 10^3$

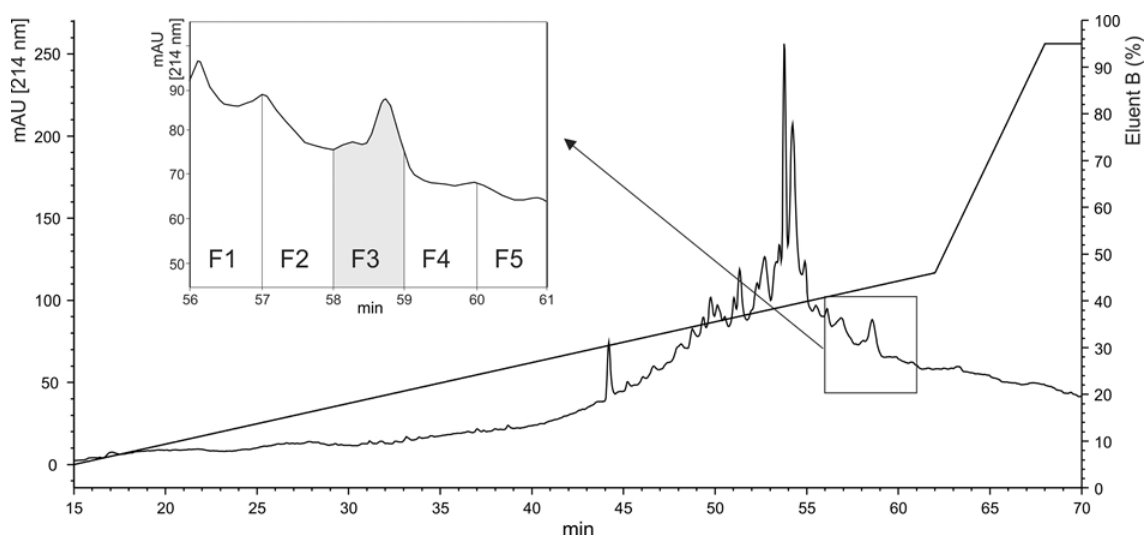
Preglednica 7: Specifična protimikrobna aktivnost [AU/mg] frakcij po RP-HPLC

Frakcija z najvišjo specifično aktivnostjo je osenčena s sivo barvo.

Table 7: Specific antimicrobial activity [AU/mg] of selected RP-HPLC fractions

Fraction with the highest specific activity is shadowed with grey

RP-HPLC frakcije	Aktivnost [AU/mL]	C _{proteinov} [mg/mL]	Aktivnost/C [AU/mg]
F ₁₊₂	$4,0 \times 10^2$	0,13	$3,0 \times 10^3$
F ₃	$2,6 \times 10^4$	0,05	$5,1 \times 10^5$
F ₄₊₅	$1,6 \times 10^3$	0,05	$2,0 \times 10^4$



Slika 10: Kromatogram RP-HPLC, ki prikazuje ločevanje frakcije SPE, pridobljene po spiranju izsoljenih proteinov iz supernatanta kulture *L. gasseri* K7 s 40 % acetonitrilom

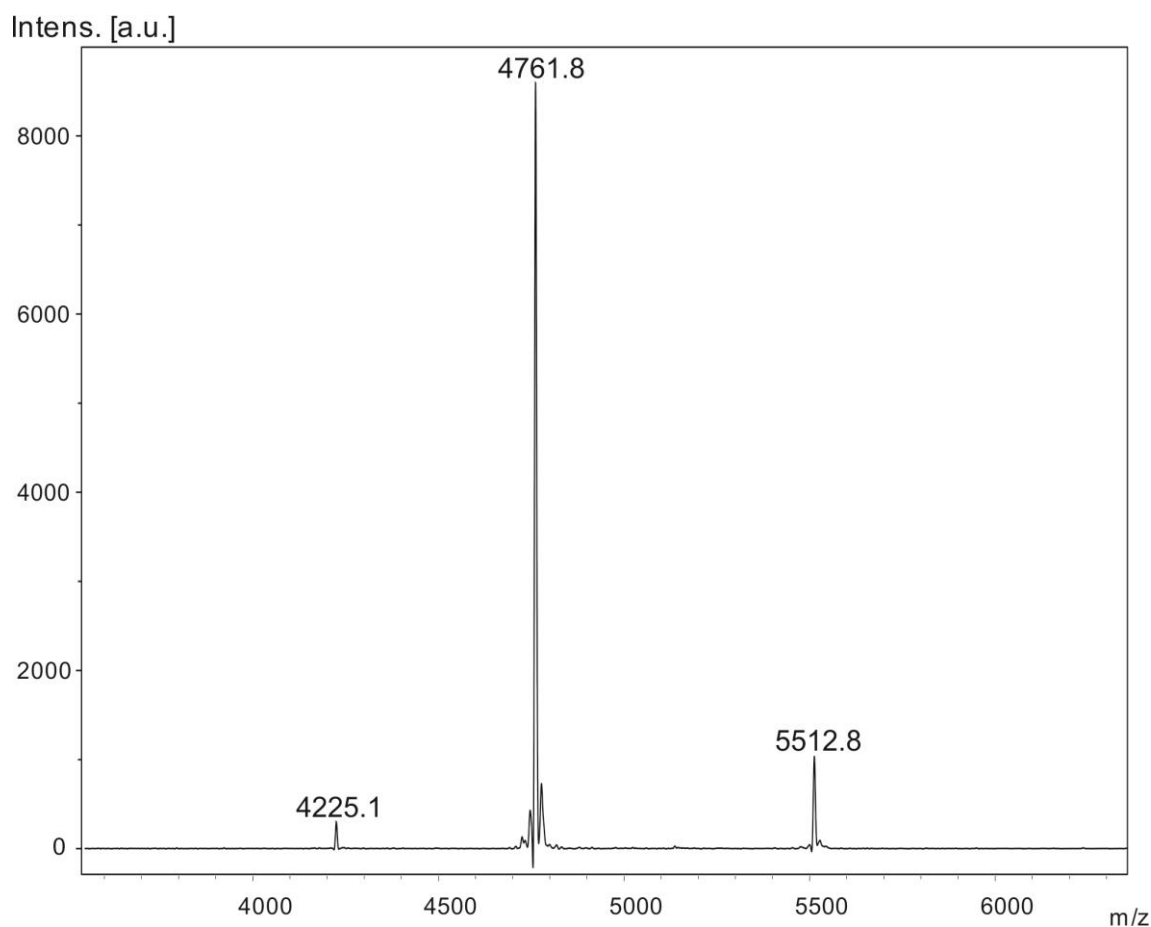
Povečana slika v zgornjem levem delu kromatograma predstavlja področje frakcij, v katerih je bila izmerjena največja protimikrobna aktivnost. Frakcija z največjo specifično aktivnostjo, je osenčena s sivo barvo (F₃).

Figure 10: RP-HPLC chromatogram of SPE fraction obtained by 40 % acetonitrile elution of *L. gasseri* K7 culture supernatant salted-out proteins

The magnified area of the chromatogram where the highest antimicrobial activity of RP-HPLC fractions was detected is shown in the upper left corner. The fraction with the highest bacteriocin activity is shadowed with grey (F₃).

4.3.2 Analiza peptidov z masno spektrometrijo

V frakciji F₃, pridobljeni s kromatografijo z obrnjenimi fazami, so bili z masno spektrometrijo (MALDI-TOF) detektirani peptidi z različnimi molekulskimi masami, in sicer 4225,1 Da, 4761,8 Da in 5512,8 Da. Peptid z molekulsko maso 4761,8 Da predstavlja glavni vrh v masnem spektru, s približno 10-krat večjo ionsko intenziteto v primerjavi z ostalima dvema peptidoma (**slika 11**).



Slika 11: Masni spekter (MALDI-TOF) frakcije F₃

Figure 11: MALDI-TOF mass spectra of RP-HPLC fraction F₃

Z LC-MS/MS je bila določena aminokislinska sekvenca peptidov v frakciji F₃. Aminokislinska sekvenca detektiranih peptidov se je ujemala z aminokislinsko sekvenco peptida GatX, komplementarnega peptida gasericina T. Če izvzamemo N-terminalno sekvenco prepeptida, je bilo z metodo LC-MS/MS detektirane 96 % celotne aminokislinske sekvence peptida (46/48 aminokislin; **slika 12**). Izolirani peptid z molekulsko maso 4761,8 ni vseboval N-terminalne sekvence.

10	20	30	40	50	60
<u>MALKTLEKHE LRNV</u> MGGNKW GNAVIGAATG ATRGVSWCRG FGPWGMTACG LGGAAIGGYL GYKSN					
NKW GNAVIGAATG ATRGVSWCRG FGPWGMTACG LGGAAIGGYL GYKSN					

Slika 12: Primerjava aminokislinske sekvence peptida GatX, izpeljane iz nukleotidnega zaporedja peptida GatX, domnevnega komplementarnega peptida gasericina T in peptida, izoliranega iz kulture seva *Lactobacillus gasseri* K7

Zgornja vrsta prikazuje aminokislinsko sekvenco pre-peptida GatX (vodilna N-terminalna sekvenca je podčrtana), spodnja vrsta pa aminokislinsko sekvenco peptida (MW=4761,8 Da) iz frakcije F₃ po RP-HPLC, določeno z masno spektrometrijo (LC-MS/MS).

Figure 12: Comparison of the amino acid sequence of GatX peptide, deduced from a putative complementary peptide of gasericin T, and of the peptide isolated from the *Lactobacillus gasseri* K7 culture

Upper line, amino acid sequence of GatX pre-peptide (N-terminal leader sequence is underlined). Lower line, amino acid sequence of a peptide (MW=4761.8 Da) determined in RP-HPLC fraction F₃ by mass spectrometry analysis (LC-MS/MS).

4.4 PROTIMIKROBNI SPEKTER SEVA *L. gasseri* K7 TER IZOLIRANEGA AKTIVNEGA PEPTIDA GASERICINA K7 B

Spekter protimikrobne aktivnosti frakcije F₃, ki je vsebovala očiščeni aktivni peptid gasericina K7 B, smo ugotavljali s »spot-test«-om na agarju. Preskusili smo nevtraliziran in filtriran supernatant kulture *L. gasseri* K7, izoliran aktivni peptid gasericina K7 B, kot tudi kulturo samo. Kulturo seva smo predhodno gojili na ploščah 24 ur, da so se metaboliti sintetizirali in difundirali v gojišče. Pri tem smo uporabili indikatorske seve iz naslednjih rodov: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* in *Clostridium*. Preskus je pokazal čiste inhibicijske cone pri vseh indikatorskih sevih *Lactobacillus* z izjemo *Lactobacillus gasseri* CCDM 214. Inhibicije nismo zaznali v primeru predstavnikov *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus thermophilus* ter *Listeria innocua*. Inhibicija indikatorskih sevov z izoliranim aktivnim peptidom Gas K7 B_AcP je sovpadala z rezultati inhibicije s supernatantom K7 ter kulturo K7, s tremi izjemami. Seva *Staphylococcus aureus* IM 132 in *Listeria innocua* LMG 11387 sta bila inhibirana samo s kulturo K7, ne pa z nevtraliziranim supernatantom in izoliranim peptidom. Sev *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 20481 pa je inhibiral samo izolirani peptid (**preglednica 8**).

Preglednica 8: Protimikrobna aktivnost kulture *L. gasseri* K7, nevtraliziranega supernatanta kulture K7 ter očiščene aktivne komponente Gas K7 B

Table 8: Antimicrobial spectrum of *L. gasseri* K7 culture, supernatant and purified active component Gas K7 B

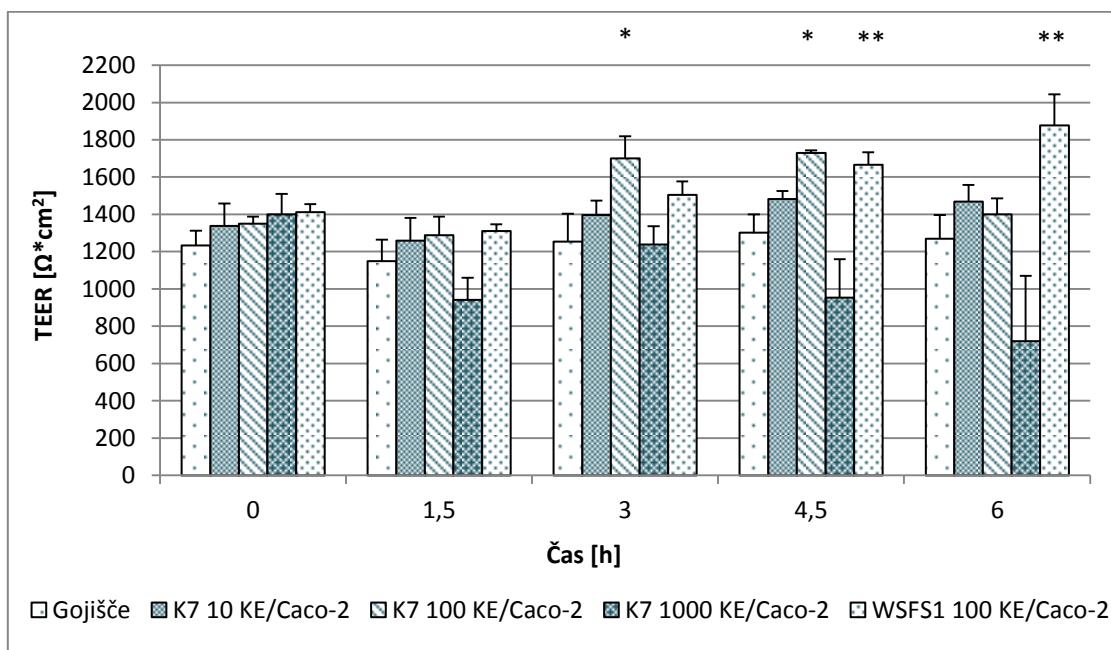
Indikatorski sev	Vir	Inhibicijska cona[mm] kultura K7	Std. d.	Inhibicijska cona [mm] supernatant	Std. d.	Inhibicijska cona [mm] Gas K7 B_AcP	Std. d.
<i>Lactobacillus helveticus</i>	ATCC 15009	12	1	11	1	6	2
<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 20243	10	1	9	2	11	0
<i>Lactobacillus gasseri</i>	FAM 17828	13	0	12	1	13	0
<i>Lactobacillus gasseri</i>	CCDM 214	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus sakei</i>	NCDO 2714	21	2	13	2	16	1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	LMG 6901T	16	0	16	0	18	2
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	DSM 20481	0	0	0	0	8	2
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	DSM 20069	9	0	9	1	10	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	LMG 7937	12	2	9	0	12	2
<i>Enterococcus faecium</i>	LMG 11423	9	1	8	2	9	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	IM 132	12	3	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	UT RN 4220	0	0	0	0	0	0
<i>Listeria innocua</i>	LMG 11387	9	1	0	0	0	0
<i>Streptococcus thermophilus</i>	LMG 6896	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	NCDO 1754	16	2	8	1	10	2
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	FAM 1617	11	1	8	0	8	0
<i>Clostridium perfringens</i>	UU 5R 875	30	2	7	1	8	1

4.5 VPLIV BAKTERIJSKIH CELIC *L. gasseri* K7 TER IZOLIRANEGA AKTIVNEGA PEPTIDA GASERICINA K7 B NA EPITELJSKO BARIERNO FUNKCIJO

4.5.1 Vpliv seva *L. gasseri* K7 ter izoliranega aktivnega peptida gasericina K7 B na transepitelijsko električno upornost intaktne celične kulture Caco-2

Vpliv različnih koncentracij celic *L. gasseri* K7 na epitelijsko barierno funkcijo smo proučevali na modelu celic Caco-2. Merili smo transepitelijsko električno upornost (TEER) celic Caco-2, nasajanih na plošče s 24-imi jamicami. Celice Caco-2 smo za 6 h izpostavili trem različnim koncentracijam seva K7 (10 KE/Caco-2, 100 KE/Caco-2, 1000 KE/Caco-2) ter izmerili TEER vsako 1,5 h. Sev *Lactobacillus plantarum* WCFS1 smo uporabili kot pozitivno kontrolo.

Izmerjene vrednosti TEER monosloja netretiranih celic Caco-2 so bile v povprečju okrog $1300 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Ko smo celice Caco-2 izpostavili laktobacilom seva K7 v koncentraciji 10 KE/Caco-2, se vrednosti TEER tekom 6 ur niso statistično značilno spreminjale in se niso značilno razlikovale od vrednosti TEER netretiranih celic Caco-2. Po dodatku 100 KE/Caco-2 seva K7 se je TEER statistično značilno povečala po 3 h inkubiranja, ohranila podobne vrednosti še nadaljnjo 1,5 h inkubacije, zatem pa se je zmanjšala. Pri koncentraciji 1000 KE/Caco-2 pa je bila TEER manjša od izhodiščne že po 1,5 h tretiranju, in kljub manjšemu povišanju med 1,5 h in 3 h ni dosegla vrednosti, izmerjenih pri netretiranih celicah Caco-2. Sev *Lactobacillus plantarum* WCFS1 v koncentraciji 100 KE/Caco-2 je statistično značilno povišal TEER celic Caco-2 po 4,5 h, nato se je vrednost TEER zviševala še do 6 h inkubacije (**slika 13**).



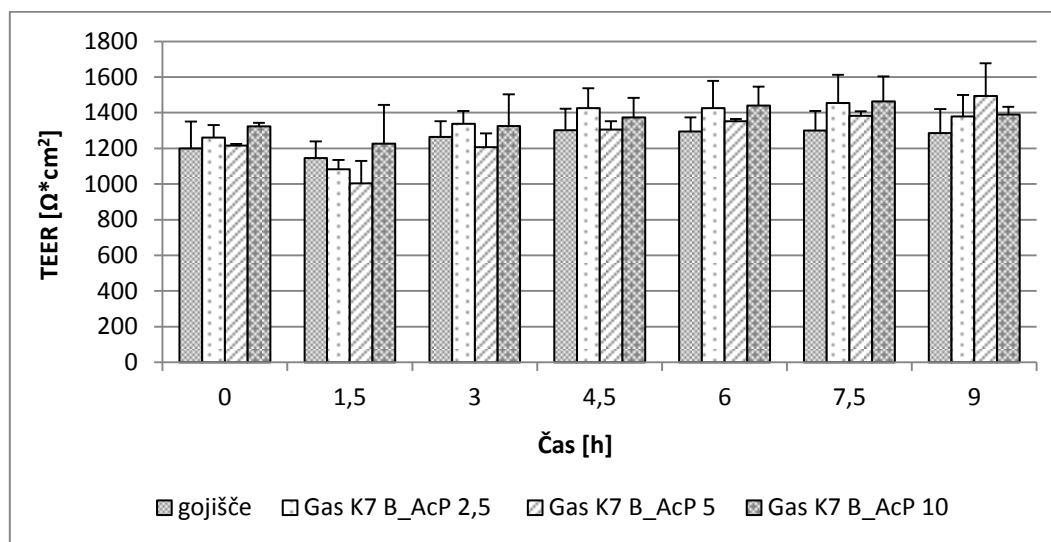
Slika 13: Vpliv različnih koncentracij seva *L. gasseri* K7 (10 KE/Caco-2, 100 KE/Caco-2 in 1000 KE/Caco-2) na TEER monosloja celic Caco-2

Za vsako vrednost je prikazan standardni odklon. Zvezdica (*) prikazuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) med vrednostmi TEER netretiranih (gojišče) in s sevom K7 (100 KE/Caco-2) tretiranih celic Caco-2; (**) prikazuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) med vrednostmi TEER netretiranih (gojišče) in s sevom WCFS1 (100 KE/Caco-2) tretiranih celic Caco-2.

Figure 13: The effect of different concentration of *L. gasseri* K7 strain (10 CFU/Caco-2, 100 CFU/Caco-2 in 1000 CFU/Caco-2) on TEER of Caco-2 monolayer

Data shown as bars are mean values with standard deviations. Asterisk (*) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) between non-treated and with K7 strain (100 CFU/Caco-2) treated Caco-2 cells; (**) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) between non-treated and with WCFS1 strain (100 CFU/Caco-2) treated Caco-2 cells.

Celice Caco-2 smo dodajali tudi očiščeno aktivno komponento gasicina K7 B ter ovrednotili spremembe z merjenjem TEER. Izbrali smo 3 različne koncentracije bakteriocina, in sicer 2,5 µg/mL, 5 µg/mL in 10 µg/mL. V času 9 h, dokler so potekale meritve, se TEER ni statistično značilno spremenila pri nobeni od dodanih koncentracij aktivne komponente gasicina K7 B, v primerjavi z netretiranimi celicami (slika 14).



Slika 14: Vpliv različnih koncentracij očiščene aktivne komponente gasericina K7 B (2,5 µg/mL, 5 µg/mL in 10 µg/mL) na TEER celic Caco-2

Za vsako vrednost je prikazan standardni odklon.

Figure 14: The effect of active component of gassericin K7 B in different concentrations (2.5 µg/mL, 5 µg/mL and 10 µg/mL) on TEER of Caco-2 cells

Data shown as bars are mean values with standard deviations.

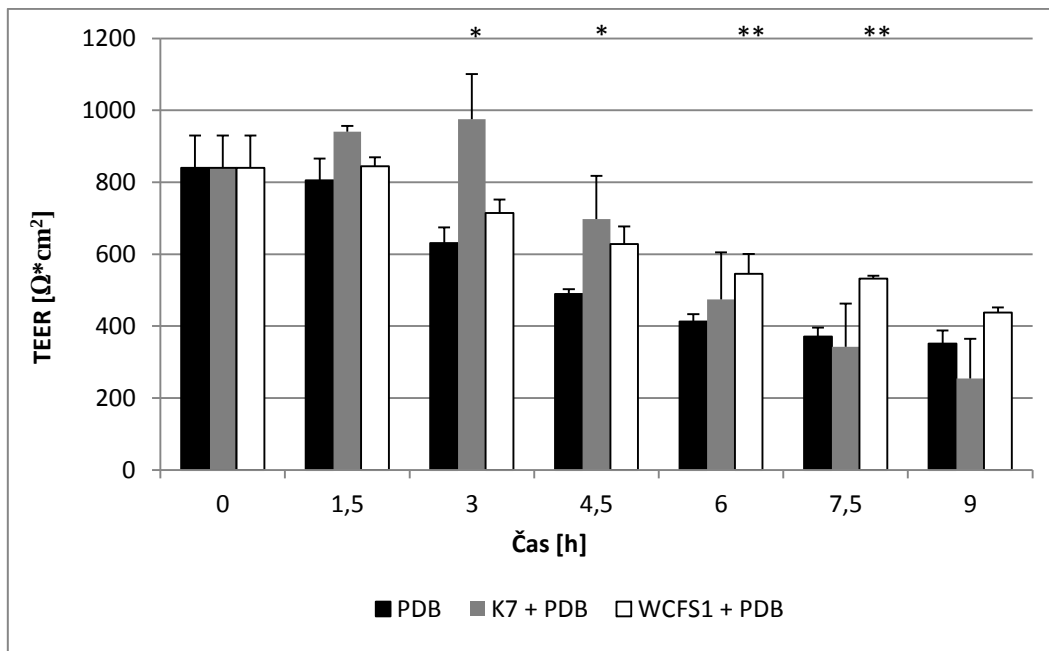
4.5.2 Vpliv seva *L. gasseri* K7 ter očiščenega aktivnega peptida gasericina K7 B na transepitelijsko električno upornost kulture Caco-2 s porušenimi tesnimi stiki

V preskusih vpliva seva *L. gasseri* K7 na TEER kulture Caco-2, ki smo ji z reagentom PDB porušili medcelične stike, smo uporabili sev K7 v koncentraciji 100 KE/Caco-2, ki se je izkazala za učinkovito v preskusih na intaktnem monosloju celične kulture Caco-2.

V prvem sklopu poskusov smo celice Caco-2 najprej tretirali istočasno s sevom K7 in PDB. V naslednjem poskusu pa smo celice tretirali predhodno 6 h s sevom K7 ter nato dodali PDB ter merili TEER.

Rezultati so pokazali, da je sev K7 v koncentraciji 100 KE/Caco-2 zadržal padec TEER, povzročene s PDB, ko so bili laktobacili dodani v gojišče istočasno s PDB. Statistično značilne razlike med vzorci z dodanimi laktobacili in brez njih smo ugotovili po 3 in 4,5

h inkubacije. Značilen učinek seva WCFS1, ki smo ga uporabili za pozitivno kontrolo, se je pokazal kasneje, po 7,5 in 9 h inkubiranja (slika 15).



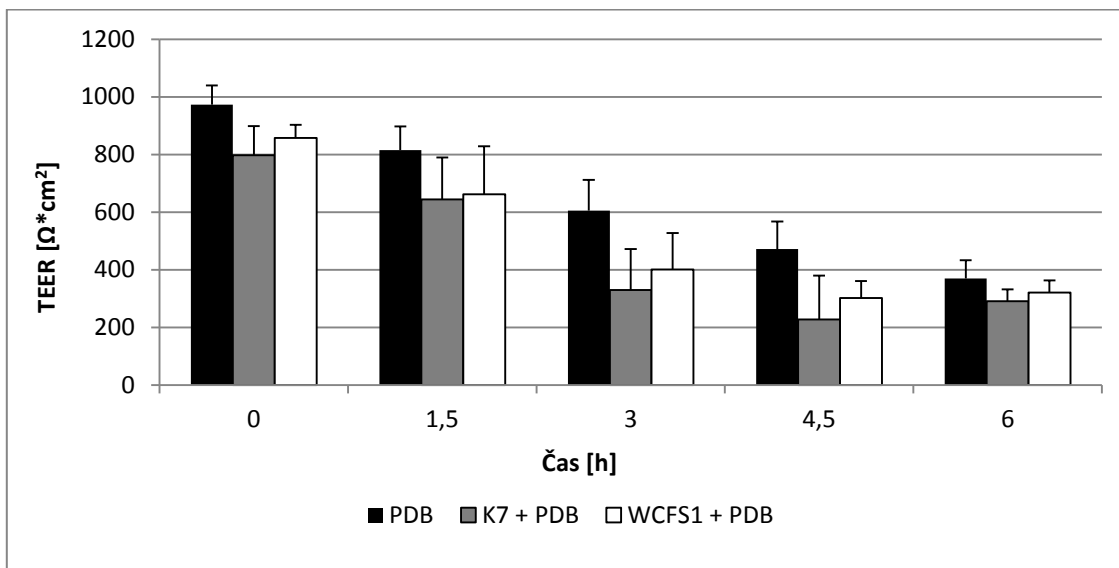
Slika 15: Vpliv seva *L. gasseri* K7 (100 KE/Caco-2), dodanega celicam Caco-2 hkrati s PDB, na TEER

Za vsako vrednost je prikazan standardni odklon. Zvezdica (*) označuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) med vrednostmi TEER celic Caco-2, tretiranih s PDB in sevom K7 (100 KE/Caco-2) hkrati in vrednostmi TEER celic, tretiranih samo s PDB; (**) označuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) med vrednostmi TEER celic Caco-2, tretiranih s PDB in kontrolnim sevom WCFS1 (100 KE/Caco-2) hkrati in vrednostmi TEER celic, tretiranih samo s PDB.

Figure 15: The effect of *L. gasseri* K7 strain (100 KE/Caco-2) incubated with PDB simultaneously on TEER of Caco-2 cells

Data shown as bars are mean values with standard deviations. Asterisk (*) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) between TEER values of Caco-2 treated with PDB and K7 simultaneously; (**) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) between TEER values of Caco-2 treated with WCFS1 strain and PDB simultaneously and Caco-2 treated with PDB.

V nadaljevanju smo celicam Caco-2 dodali sev K7 v koncentraciji 100 KE/Caco-2. Po 6 h inkubacije s sevom K7 v koncentraciji 100 KE/Caco-2 smo dodali PDB v koncentraciji 25 μ M in inkubirali še 6 h. TEER smo merili vsako 1,5 h. Rezultati so pokazali, da tretiranje celic Caco-2 s sevom K7 pred porušenjem celičnih stikov s PDB ni zadržalo padca TEER po tretiranju s PDB (slika 16).



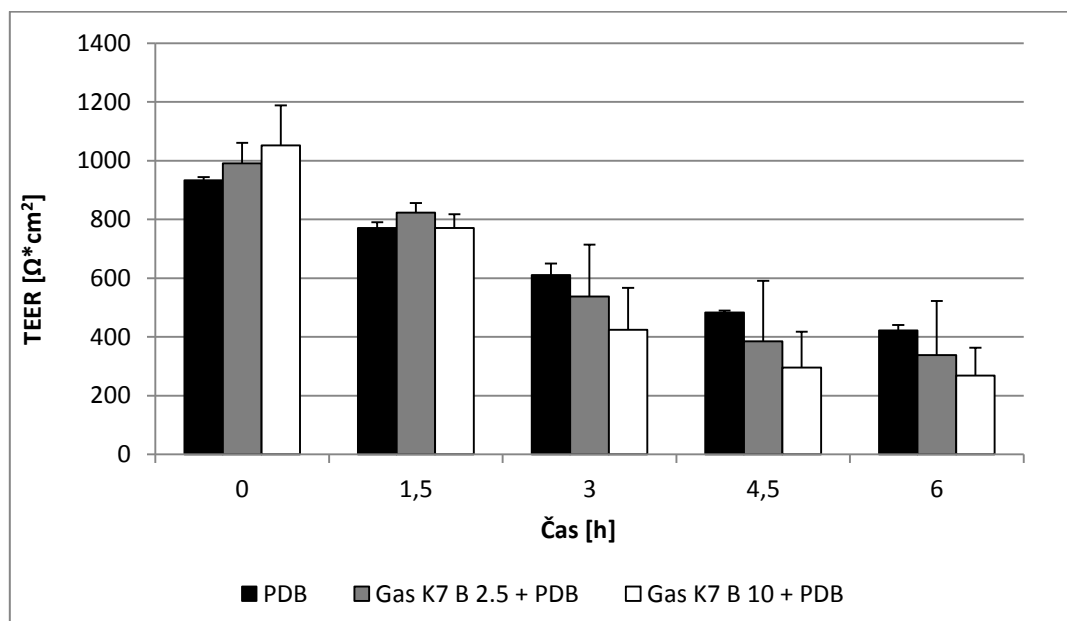
Slika 16: Vpliv PDB na TEER po predhodnem 6 h tretiranju celic Caco-2 s sevom *L. gasseri* K7 v koncentraciji 100 KE/Caco-2

Za vsako vrednost je prikazan standardni odklon.

Figure 16: The effect of PDB on TEER after 6 h treatment with *L. gasseri* K7 strain in concentration 100 KE/Caco-2

Data shown as bars are mean values with standard deviations.

Raziskali smo tudi, ali aktivna komponenta gasericina K7 B vpliva na padec TEER, povzročen s PDB. Caco-2 celice smo tretirali z 2 različnima koncentracijama gasericina K7 B (2,5 µg/mL in 10 µg/mL) ter istočasno s PDB v koncentraciji 25 µM. Rezultati so pokazali, da izolirani peptidi Gas K7 B_AcP v nobeni od preskušanih koncentracij niso statistično značilno vplivali na padanje TEER, ki je bilo posledica porušjenja tesnih stikov s PDB (**slika 17**).



Slika 17: Vpliv aktivne komponente gasericina K7 B (2,5 in 10 µg/mL) in PDB istočasno na TEER monosloja celične kulture Caco-2

Za vsako vrednost je prikazan standardni odklon.

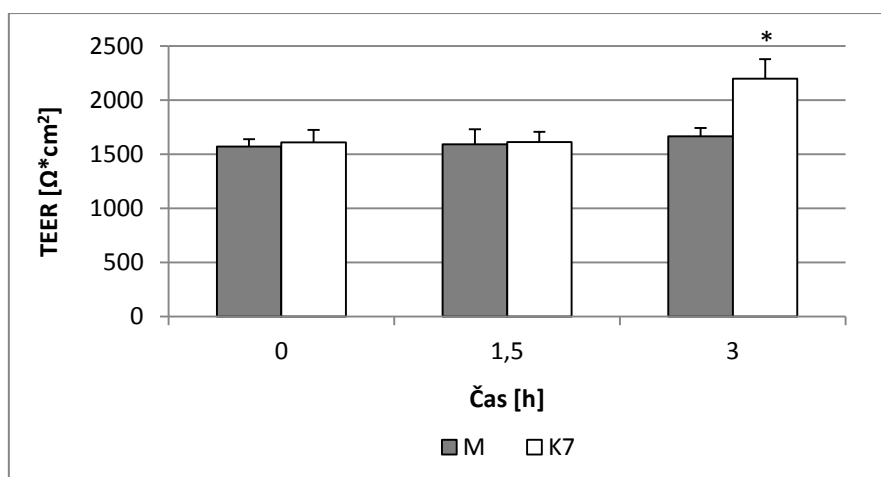
Figure 17: The effect of gassericin K7 B active komponent (2.5 and 10 µg/mL) and PDB simultaneously on TEER of Caco-2 cells monolayer

Data shown as bars are mean values with standard deviations.

4.5.3 Razporejanje proteinov tesnih stikov (okludin, ZO-1)

4.5.3.1 Merjenje TEER celic Caco-2 na membranah

Celice Caco-2, nasajene na membrane, smo vzorčili po 3 h inkubiranja s sevom K7 v koncentraciji 100 KE/Caco-2. Izmerjena vrednost TEER celic Caco-2, ki so bile tretirane s sevom K7, je bila statistično značilno večja od vrednosti TEER celic, ki niso bile v stiku z laktobacili (kontrola – gojišče). Celice Caco-2 smo fiksirali, proteine tesnih stikov označili s specifičnimi protitelesi ter analizirali s konfokalnim mikroskopiranjem (slika 18).



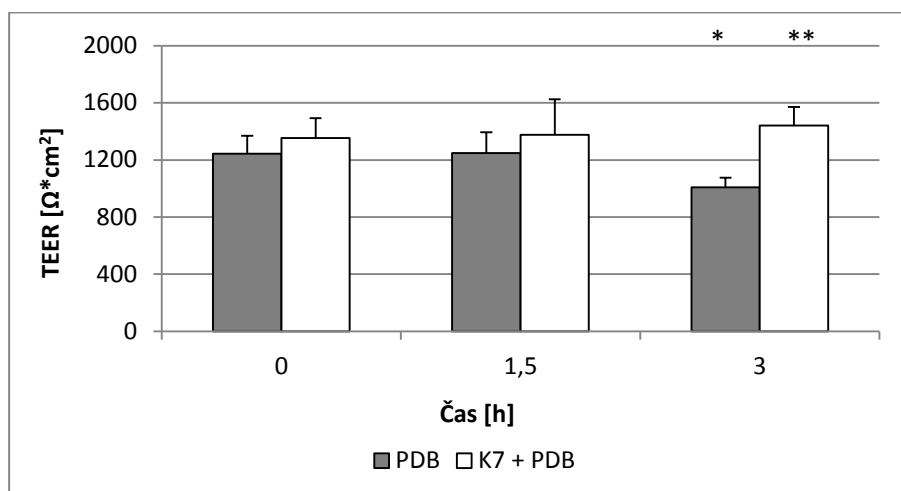
Slika 18: TEER celic Caco-2, nasajenih na membrane in vzorčenih za analize s konfokalnim mikroskopiranjem

Za vsako vrednost je prikazan standardni odklon. Zvezdica (*) označuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) med vrednostmi TEER celic Caco-2, tretiranih z gojiščem (M) in vrednostmi TEER celic, tretiranih s sevom K7 (K7) v koncentraciji 100 KE/Caco-2.

Figure 18: TEER of Caco-2 cells on membranes and sampled for analysis with confocal microscopy

Data shown as bars are mean values with standard deviations. Asterisk (*) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) between values TEER in Caco-2 cells treated with medium (M) and Caco-2 cells treated with K7 strain (K7) in concentration 100 CFU/Caco-2.

Sev K7 v koncentraciji 100 KE/Caco-2 in PDB smo hkrati nanesti apikalno stran monosloja celic Caco-2 ter merili TEER. Po 3 h inkubacije je razlika med TEER pri celicah, tretiranih samo s PDB, in celicah, tretiranih s sevom *L. gasseri* K7 in PDB hkrati, statistično značilna. Na tej točki smo celice fiksirali, jih označili s specifičnimi protitelesi ter analizirali s konfokalnim mikroskopiranjem (slika 19).



Slika 19: TEER celic Caco-2, tretiranih s PDB in PDB ter *L. gasseri* K7 istočasno ter vzorčenih po 3 h inkubacije za pripravo preparatov za analiziranje s konfokalnim mikroskopiranjem

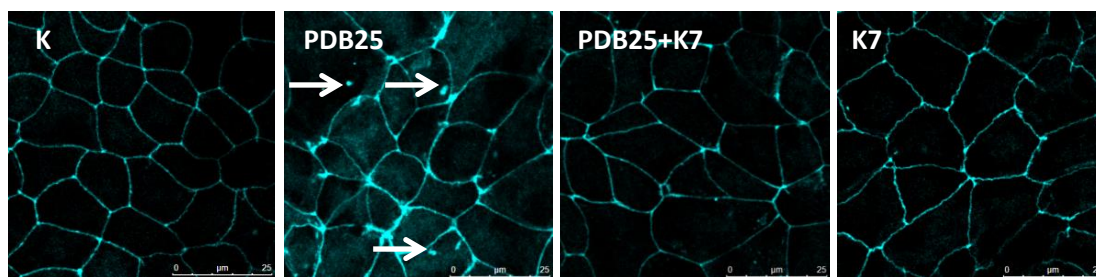
Za vsako vrednost je prikazan standardni odklon. Zvezdica (*) označuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) med vrednostmi TEER celic, tretiranih s PDB 1,5 h in vrednostmi TEER celic, tretiranih s PDB 3 h; (**) označuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) med vrednostmi TEER celic, tretiranih samo s PDB in vrednostmi TEER celic, tretiranih istočasno z *L. gasseri* K7 s PDB.

Figure 19: TEER of the Caco-2 cells treated with PDB and PDB and *L. gasseri* K7 strain simultaneously and sampled after 3 h of incubation for confocal microscopy analysis

Data shown as bars are mean values with standard deviations. Asterisk (*) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) between values measured in cells treated with PDB after 1.5 h and 3 h of incubation; (**) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) between values measured in cells treated with PDB and in cells treated with PDB and K7 strain simultaneously.

4.5.3.2 Vpliv seva K7 in PDB na razporejanje okludina

Celice Caco-2 so bile vzorčene po 3 h inkubacije ter označene s primarnim konjugiranim protitelesom za okludin. Preparate smo pregledali in posneli s konfokalnim mikroskopom. Na **sliki 20 K** so celice, tretirane z gojiščem (kontrola). Na **sliki 20 PDB25** so celice Caco-2, tretirane s PDB v koncentraciji 25 μ M. S puščicami so označeni delci, ki se nahajajo izven celične membrane. Na **sliki 20 PDB25+K7** so prikazane celice Caco-2, tretirane s PDB in sevom K7 v koncentraciji 100 KE/Caco-2. Izven celične membrane ni vidnih fluorescenčno označenih delcev. Na **sliki 20 K7** so celice Caco-2, tretirane s sevom K7 v koncentraciji 100 KE/Caco-2. Celična membrane je rahlo nagubana, vendar izven membrane ni opaženih fluorescenčno označenih delcev.



Slika 20: Razporeditev proteinov tesnih stikov – okludina

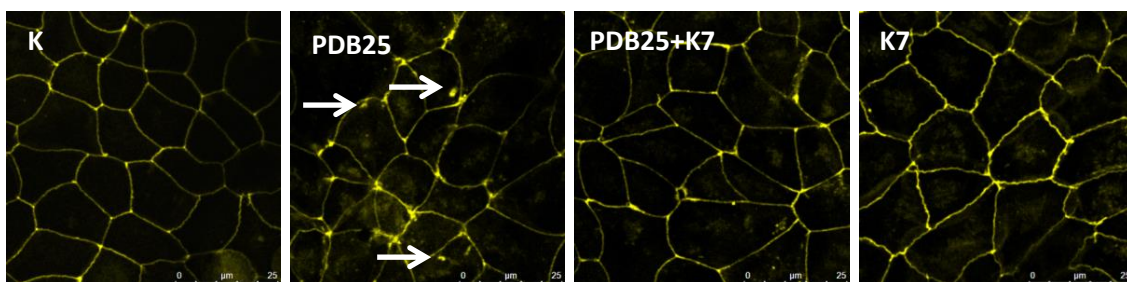
Celice Caco-2, tretirane z: K – netretirane Caco-2 (kontrola); PDB25 – Caco-2, tretirane s 25 μ M PDB; PDB25+K7 – Caco-2, tretirane s 25 μ M PDB in z *L. gasseri* K7 (100 KE/Caco-2); K7 – Caco-2, tretirane z *L. gasseri* K7 (100 KE/Caco-2). Puščice prikazujejo fluorescenčno označene delce znotraj celične membrane.

Figure 20: The distribution of the tight junction proteins – occludin

Caco-2 cells treated with: medium (K - control); PDB25 – Caco-2 treated with 25 μ M PDB; PDB25+K7 – Caco-2, treated with combination of 25 μ M PDB and *L. gasseri* K7 (100 CFU/Caco-2); K7 – Caco-2, treated with *L. gasseri* K7 strain (100 CFU/Caco-2). The arrows show fluorescently marked particles inside the cells.

4.5.3.3 Vpliv seva K7 in PDB na razporejanje ZO-1

Celice so bile vzorčene po 3 h inkubiranja in označene s protitelesi za označevanje proteina ZO-1. Preparate smo pregledali in posneli s konfokalnim mikroskopom. Na **sliki 21 K** so celice, tretirane samo z gojiščem (kontrolne celice). Na **sliki 21 PDB25** so celice, tretirane s 25 μ M PDB. S puščicami so prikazani fluorescenčno označeni delci, ki se nahajajo izven celične membrane. Na **sliki 21 PDB25+K7** so prikazane celice, tretirane s kombinacijo PDB in seva K7 v koncentraciji celic 100 KE/Caco-2. Izven celične membrane ni opaziti fluorescenčno označenih delcev. Na **sliki 21 K7** so prikazane celice, tretirane s sevom K7 v koncentraciji 100 KE/Caco-2. Celična membrane je rahlo nagubana, vendar izven celične membrane ni opaženih fluorescenčno označenih delcev.



Slika 21: Razporeditev proteinov tesnih stikov - ZO-1

Celice Caco-2 so bile tretirane z: K – netretirane Caco-2 (kontrola); PDB25 – Caco-2 s 25 μ M PDB; PDB25+K7 – Caco2 s 25 μ M PDB in hkrati z *L. gasseri* K7 (100 KE/Caco-2); K7 - Caco2 s sevom *L. gasseri* K7 (100 KE/Caco-2). Puščice prikazujejo fluorescenčno označene delce v citoplazmi celic.

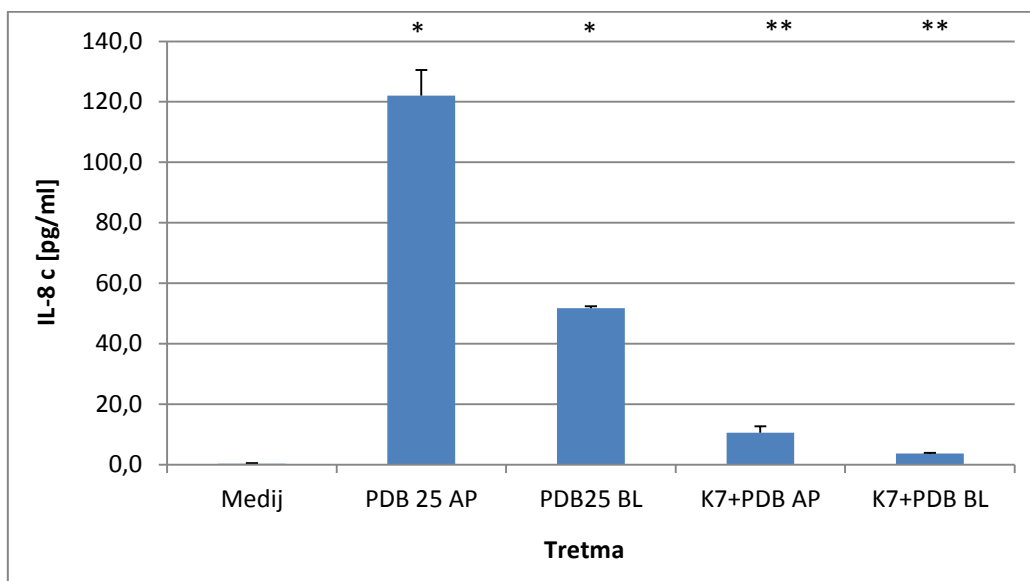
Figure 21: The distribution of the tight junction proteins - ZO-1

Caco-2 cells, treated with: medium (K - control); PDB25 – Caco-2 treated with 25 μ M PDB; PDB25+K7 – Caco2, treated with combination of 25 μ M PDB and *L. gasseri* K7 (100 CFU/Caco-2); K7 - Caco2, treated with *L. gasseri* K7 strain (100 CFU/Caco-2). The arrows show fluorescently marked particles inside the cells.

4.6 VPLIV SEVA *L. gasseri* K7 TER IZOLIRANEGA AKTIVNEGA PEPTIDA GASERICINA K7 B NA IZLOČANJE PROVNETNIH CITOKINOV CELIC Caco-2 IN THP-1

4.6.1 Vpliv seva *L. gasseri* K7 na koncentracijo izločenega IL-8 celic Caco-2

V supernatantu kulture Caco-2 smo izmerili koncentracijo izločenega IL-8, in sicer po 3 h inkubiranja celic Caco-2 v prisotnosti PDB, *L. gasseri* K7 ali kombinacijo obeh, ko je bila TEER maksimalno povišana. Po 3 h inkubacije smo odpipetirali gojišče ter s kompletom reagentov za test ELISA izmerili količino izločenega IL-8 v gojišču, vzorčenem na apikalni in bazolateralni strani membran. Meritve so pokazale, da PDB statistično značilno vpliva na povečanje koncentracije IL-8 tako na apikalni (120 pg/mL) kot tudi na bazolateralni (50 pg/mL) strani monosloja celic Caco-2, nasajenih na membrane v primerjavi s celicami inkubiranimi samo z gojiščem. Prav tako smo ugotovili, da je sev K7 ob sočasnem dodatku PDB statistično značilno zmanjšal izločanje IL-8 v primerjavi s celicami, tretiranimi s PDB na apikalni strani. V gojišču, odvzetem na apikalni strani, smo izmerili 10 pg/mL, v gojišču iz bazolateralne strani pa 5 pg/mL IL-8 (**slika 22**).



Slika 22: Koncentracija IL-8 v gojišču, odvzetem na apikalni (AP) in bazolateralni (BL) strani monosloja celic Caco-2

Dodatek apikalno: PDB ($c=25 \mu\text{M}$), *L. gasseri* K7 (100 KE/Caco-2) ali kombinacija K7 + PDB. Za vsako vrednost je prikazan standardni odklon. Zvezdica (*) prikazuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) med netretiranimi celicami Caco-2 in Caco-2, tretiranimi s PDB (gojišče, vzorčeno apikalno in bazolateralno); (**) označuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) med Caco-2, tretiranimi s PDB in Caco-2 tretiranimi s kombinacijo PDB + K7 (gojišče, vzorčeno apikalno in bazolateralno).

Figure 22: Concentration of IL-8 in medium after sampled the supernatant on apical (AP) and bazolateral (BL) side of the Caco-2 monolayer

Treatment of cells on apical side of membrane with: PDB ($c=25 \mu\text{M}$), *L. gasseri* K7 (100 CFU/Caco-2) or combination (K7 + PDB). Data shown as bars are mean values with standard deviations. Asterisk (*) statistically significant difference ($p < 0.05$) between non-treated Caco-2 cells (medium) and Caco-2 treated with PDB and sampled on apical and basolateral side; (**) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) between Caco-2 treated with PDB and Caco-2 treated with combination of PDB and K7 and sampled on apical and basolateral side.

4.6.2 Vpliv aktivne komponente gasericina K7 B na koncentracijo provnetnih citokinov v supernatantu kulture celic THP-1

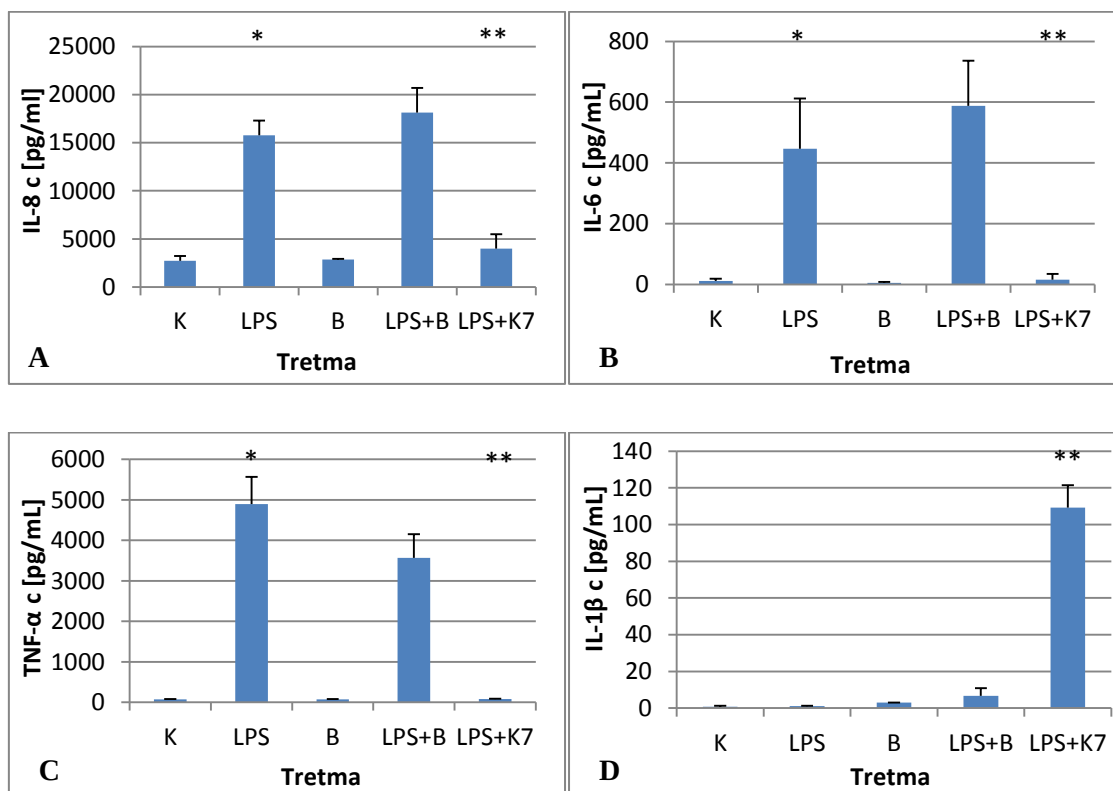
S testom »sendvič« ELISA smo ovrednotili sintezo glavnih provnetnih citokinov (IL-1 β , IL-6, IL-8 in TNF- α) celic THP-1 po 6 h inkubaciji v prisotnosti 10 μ g/mL aktivne komponente gasericina K7 B. Za negativno kontrolo smo uporabili gojišče RPMI, kot kontrolo pa sev *L. gasseri* K7 (Hacin, 2010). Z LPS smo stimulirali celice k izločanju provnetnih citokinov ter ovrednotili zmožnost aktivne komponente gasericina, da vpliva na raven izločanja provnetnih citokinov. Statistično smo primerjali tretmaje z LPS in izoliranim peptidom glede na tretma z gojiščem. Kombinacijo izoliranega peptida z LPS in seva K7 z LPS pa smo statistično primerjali glede na tretma z LPS.

Pri merjenju koncentracije IL-8 smo ugotovili, da celice THP-1, tretirane z LPS ali z LPS in aktivno komponento gasericina K7 B hkrati (LPS+B), statistično značilno povečajo izločanje citokina IL-8 v primerjavi z negativno kontrolo in s celicami, tretiranimi samo z aktivno komponento gasericina K7 B. Pozitivna kontrola je statistično značilno znižala z LPS stimulirano izločanje IL-8 v primerjavi s tretiranjem samo z LPS, medtem ko takšnega učinka pri aktivni komponenti gasericina K7 B nismo potrdili (**slika 23 A**).

Koncentracija IL-6 je bila statistično značilno povečana v vzorcih supernatantov celic THP-1, tretiranih z LPS (450 pg/mL), v primerjavi z negativno kontrolo (40 pg/mL). Prav tako je bila statistično značilno povečana koncentracija v vzorcih, tretiranih z LPS in bakteriocinom, v primerjavi s kontrolo (590 pg/mL). Vendar bakteriocin ni uspel statistično značilno znižati koncentracije IL-6, v primerjavi z LPS. Sev K7 je uspel statistično značilno znižati koncentracijo IL-6 (30 pg/mL) v primerjavi s tretiranjem celic z LPS (**slika 23 B**).

Koncentracija TNF- α je bila statistično značilno povečana v vzorcih, tretiranih z LPS (5000 pg/mL), v primerjavi z negativno kontrolo (gojišče) (100 pg/mL). Aktivna komponenta gasericina K7 B ni statistično značilno povečala koncentracijo TNF- α v primerjavi z negativno kontrolo, prav tako ni statistično značilno zmanjšala izločanje TNF- α , kadar je bila celicam dodana istočasno z LPS ter v primerjavi s tretmajem z LPS (**slika 23 C**).

Slika 23 D prikazuje koncentracijo IL-1 β , izločenega v gojišče, v odvisnosti od tretiranja celic THP-1 z gojiščem (K), z LPS, z izoliranim aktivnim peptidom Gas K7 B (B), s kombinacijo LPS+B in s kombinacijo LPS+K7. Ker pri preskusu, opravljenem v dveh ponovitvah, nismo zasledili značilnega odziva celic THP-1 na stimulacijo z LPS, tudi ni mogoče smiselno razložiti odzivanja teh celic na istočasno tretiranje z LPS in sevom K7. Tretiranje s kombinacijo LPS+K7 je sicer izzvalo izločanje IL-1 β , vendar so bile koncentracije izredno majhne (okrog 100 pg/mL).



Slika 23: Koncentracija IL-8 (A), IL-6 (B), TNF-α (C) in IL-1β (D) (pg/mL), izmerjena v supernatantih gojišča celične linije THP-1 po 6 h stimulaciji

Tretiranje celic THP-1 z: gojiščem (K), LPS, aktivno komponento gasicina K7 B (B), kombinacijo LPS in aktivne komponente gasicina K7 B (LPS+B) ali kombinacijo LPS in *L. gasseri* K7 (LPS+K7). Za vsako vrednost je prikazan standardni odklon. Zvezdica (*) označuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) med celicami THP-1, tretiranimi z gojiščem (K) in celicami THP-1, tretiranimi z LPS; (**) označuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) med celicami THP-1, tretiranimi z LPS in celicami THP-1, tretiranimi z LPS in K7 istočasno.

Figure 23: The concentration of IL-8 (A), IL-6 (B), TNF-α (C) and IL-1β (D) (pg/mL), measured in supernatants of the THP-1 cells after 6 h of stimulation

Treatment of THP-1 cells with: medium (K), LPS, active peptide of gassericin K7 B (B), LPS and active peptide (LPS+B) simultaneously or LPS and *L. gasseri* K7 (LPS+K7) simultaneously. Data shown as bars are mean values with standard deviations. Asterisk (*) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) between THP-1 cells treated with medium (K) and THP-1 cells treated with LPS; (**) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) between THP-1 cells treated with LPS and THP-1 cells treated with LPS and K7 simultaneously.

5 RAZPRAVA

5.1 IZRAŽANJE GENOV ZA GASERICINA K7 A IN K7 B TER PROTIMIKROBNA AKTIVNOST SEVA *L. gasseri* K7

Lactobacillus gasseri je avtohtona bakterijska vrsta prebavnega trakta človeka. Lastnosti *L. gasseri*, ki prispevajo h kolonizaciji prebavnega trakta ter k probiotičnemu delovanju, vključujejo toleranco za nizek pH, odpornost proti žolčnim solem ter adhezijo na gostiteljev epitelij (Philipp, 2011; Selle in Klaenhammer, 2013). Sev *L. gasseri* K7 je zanimiv zaradi številnih probiotičnih lastnosti, ki so bile raziskane tako *in vitro* kot tudi *in vivo* (Matijašič in sod., 2000, 2001, 2003, 2004, 2006). Pomemben vidik probiotičnega delovanja je protimikrobna aktivnost, ki jo izraža sev K7 (Matijašič in sod., 2000). Dejanska vloga protimikrobne aktivnosti v interakcijah med mikroorganizmi v kompleksnem ekosistemu prebavnega trakta pa še ni dobro raziskana (Galvez in sod., 2007).

Pri sevu *L. gasseri* K7 so v preteklosti raziskali adaptacijske dejavnike, kot so toleranca za kisel pH in žolčne soli, metabolizem sladkorjev ter adhezijo na epitelijske celice, kakor tudi probiotične dejavnike, kot so kompetitivno izključevanje, proizvodnja protimikrobnih snovi ter imunomodulacija (regulacija izražanja citokinov) (Matijašič in sod., 2003, 2006; Hacin, 2010). Niso pa ovrednotili vpliva posameznih dejavnikov, ki prevladujejo v prebavnem traktu (pH, soli, encimi), na preživetje in protimikrobno aktivnost seva K7.

Pri raziskovanju proizvodnje protimikrobnih snovi seva K7 v različnih razmerah smo modificirali tekoče gojišče MRS z različnimi dejavniki, ki so značilni za prebavni trakt, po članku Granger in sod. (2008) in Fernandez in sod. (2003). Ugotovili smo, da protimikrobno aktivnost seva K7 najbolj zavirata nizek pH (pH 3) in žolčne soli. Ob izpostavljenosti seva tema dvema dejavnikoma med rastjo v gojišču MRS nismo ugotovili protimikrobne aktivnosti (**preglednica 3 in 4**). Hacin (2010) je ugotovila, da se je v razmerah nizkega pH in prisotnosti žolčnih soli, tudi število (KE/mL) seva K7 zmanjšalo. V naši raziskavi smo spremljali protimikrobno aktivnost in število KE/mL seva K7 v MRS, modificiranemu s posameznim dejavnikom ali s kombinacijo večih dejavnikov. Potrdili smo, da tudi na število KE seva K7 najbolj izmed vseh dejavnikov

vplivata pH 3 in žolčne soli (**slika 7 in 8**). Žolčne soli so toksične za bakterijske celice. Bakterije, ki živijo v razmerah s povečano koncentracijo žolčnih soli, so razvile obrambne mehanizme proti delovanju žolčnih soli. To vključuje zunanjo membrano kot difuzijsko bariero in črpalke, ki črpajo žolčne soli iz celice. Vzdrževanje teh zaščitnih mehanizmov zahteva energijo. Torej za zaščito in popravilo škode bakterije investirajo del energije, ki je drugače namenjena za rast. Z energetskega vidika je sinteza bakteriocinov in ostalih protimikrobnih molekul energetsko zahteven proces. Torej lahko sklepamo, da bakterije v razmerah povišane koncentracije žolčnih soli porabijo energijo za preživetje in je ne vlagajo v rast in proizvodnjo protimikrobnih snovi (Phillip, 2011). Sekvenciranje genoma seva *L. gasseri* ATCC 33323 je pokazalo osnove za preživetje prehoda seva skozi prebavni trakt kot tudi potencialni probiotični genotip. Sev *L. gasseri* ATCC 33323 ima namreč zapise za proteazne šaperone, ki služijo zaščiti pred agregacijo proteinov znotraj celice med stresnimi razmerami. K boljšemu preživetju prispeva tudi prisotnost hidrolaze in transporterjev žolčnih soli. Raziskovanje preživetja različnih sevov vrste *L. gasseri* v simuliranem želodčnem soku je pokazalo, da je odvisno od seva, vendar v splošnem lahko zaključimo, da so sevi *L. gasseri* tolerantni za kislo okolje in visoko koncentracijo žolčnih soli (Selle in Klaenhammer, 2013). Pri bifidobakterijah so dokazali, da oba dejavnika, tako kisel pH kot tudi žolčne soli, povzročita zakisanje citoplazme. Torej kisel pH ima podobne učinke na bakterijsko celico kot žolčne soli: poškodbe struktur membrane, DNA in proteinov (Mills in sod., 2011). Za proučevanje preživetja v razmerah prebavil v zadnjem času uporabljajo napredne sisteme *in vitro*, ki simulirajo razmere v želodcu in različnih delih črevesa (Ritter in sod., 2009; Sumeri in sod., 2010). Ritter in sod. (2009) so v bioreaktorju, ki simulira prehod skozi želodec in črevo, pokazali dobro preživetje seva *L. gasseri* K7.

Že v preteklih raziskavah so ugotovili, da genom seva *L. gasseri* K7 nosi genske zapise za dva dvo-komponentna bakteriocina, ki so jih poimenovali gasericin K7 A in gasericin K7 B (Majhenič in sod., 2004; Peternel in sod., 2010). Operon gasericina K7 A sestavljajo 3 geni: gen za komplementarni peptid, gen za aktivni peptid ter gen za peptid imunosti. Na operonu, ki nosi zapis za gasericin K7 B, ležijo geni za naslednje peptide: akcesorni peptid, transportni peptid, komplementarni peptid, aktivni peptid ter protein imunosti (Peternel in sod., 2010). Za vse gene so bili skonstruirani začetni

oligonukleotidi ter preskušeni s konvencionalno PCR (Treven in sod., 2013). Medtem ko so v preteklosti že raziskali sestavo gojišča za optimalno protimikrobno aktivnost seva *L. gasseri* K7 (Stojković, 2003), pa o dinamiki izražanja posameznih genov bakteriocinskih operonov in proizvodnji posameznih bakteriocinov ni podatkov.

PCR v realnem času je občutljiva metoda, ki jo lahko uporabljamo tudi za sledenje izražanja genov (Granger in sod., 2008; Galvez in sod., 2007). S to metodo smo analizirali izražanje bakteriocinskih genov med 10-urno rastjo seva K7 v tekočem gojišču MRS. Raziskali smo izražanje genov, ki kodirajo peptide, ki prispevajo k proizvodnji in delovanju gasericinov ter zaščiti celice, ki jih proizvaja, pred delovanjem lastnih bakteriocinov. Zasledili smo izražanje vseh tarčnih genov: za gasericin K7 A (komplementarni peptid, aktivni peptid in peptid imunosti) ter za gasericin K7 B (peptid za transport, akcesorni peptid, komplementarni peptid, aktivni peptid ter peptid imunosti). Izražanje je doseglo vrh po 4 h inkubiranja seva K7 pri 37 °C, največjo protimikrobno aktivnost v gojišču MRS pa smo izmerili po 8 h (**slika 5 in 6**). Rezultati dinamike izražanja genov za gasericine seva K7 so dobra osnova za nadaljnje raziskovanje bakteriocinogenega delovanja seva v bolj kompleksnih okoljih. V literaturi nismo zasledili podatkov o izražanju bakteriocinov v prebavilih *in vivo*, so pa raziskovali ta problem *in vitro* v razmerah, ki so simulirale razmere v prebavnem traktu. Granger in sod. (2008) so z metodo PCR v realnem času proučevali vpliv razmer, ki vladajo v prebavnem traktu, na preživetje seva *Enterococcus mundtii* ST4SA in proizvodnjo bakteriocina bacST4SA, vendar je proizvodnja le-tega očitna tudi v razmerah, ki so značilne za prebavni trakt. Hurtado in sod. (2011) pa so z metodo RT-PCR spremljali izražanje bakteriocinskih genov plantaricina S v sevu *Lactobacillus pentosus* B96 iz fermentiranih zelenih oliv, pod vplivom različnih koncentracij NaCl. Pri sevu, ki so ga gojili v tekočem gojišču MRS, je gen za plantaricin S dosegel maksimalno izražanje med lag fazo rasti, medtem ko se je gen za *plnE/F* izražal med stacionarno fazo. Ob prisotnosti natrijevega klorida v gojišču se je maksimalno izražanje gena za plantaricin S premaknilo v stacionarno fazo rasti, ne glede na koncentracijo soli, medtem ko se izražanje za gen *plnE/F* ni spremenilo.

Da bi ugotovili fizikalno-kemijske lastnosti, specifičnost ter spekter delovanja gasericinov, smo jih osamili in očistili. Tako je tudi v naši raziskavi testiranju izražanja bakteriocinskih genov sledil sklop, v katerem smo se osredotočili na proteinski nivo. Naš cilj je bil izolirati aktivne peptide gasericinov K7 A in B, ki se izločajo v gojišče, kadar sev izpostavimo primernim razmeram.

5.2 ČIŠČENJE IN IDENTIFIKACIJA PEPTIDOV GASERICINOV K7

Stojkovič (2003) je optimiziral sestavo gojišča, ki je temeljilo na sestavinah gojišča MRS (De Man in sod., 1960), za optimalno proizvodnjo protimikrobnih snovi seva *Lactobacillus gasseri* K7. Tako sestavljeno gojišče (mMRS) smo uporabili tudi v našem poskusu za gojenje seva K7 v bioreaktorju (2500 mL), z namenom proizvodnje bakteriocinov in njihove izolacije.

Za izolacijo bakteriocinov seva K7 smo izbrali protokol Nissen-Meyer-ja in sod. (1992), ki upošteva nizko molekulsko maso, kationsko naravo ter hidrofobnost bakteriocinov. Protokol sestavljajo izsoljevanje proteinov iz supernatanta kulture K7 z amonijevim sulfatom, ki mu sledi frakcioniranje preko več stopenj kromatografije z obrnjenimi fazami. Z namenom zmanjšanja števila korakov smo pripravili vzorec s pomočjo kolon SPE v kombinaciji s preparativno RP-HPLC. S tem smo dosegli časovno in materialno bolj učinkovit postopek čiščenja, s katerim smo pridobili dovolj veliko količino bakteriocinov za nadaljnje testiranje *in vitro*. Ugotovili smo sestavo peptida (aminokislinska sekvenca in masa), ovrednotili protimikrobni spekter ter učinkovanje na celice modelov Caco-2 (TEER) ter THP-1 (imunomodulacija).

Izkoristek protimikrobne aktivnosti po izsoljevanju proteinov (42 %) je bil manjši v primerjavi z izsoljevanjem pri čiščenju acidocinov LF221 (Matijašić in sod., 1998), vendar primerljiv z rezultati nekaterih drugih raziskav, kot pri raziskavi plantaricina ASM1 (Todorov in sod., 2004). Po ločevanju proteinov na kolonah SPE s postopnim večanjem % acetonitrila in končnega spiranja z 2-propanolom, je bila največja specifična aktivnost $1,4 \times 10^5$ AU/mg proteinov v frakciji, dobljeni po spiranju s 40 % acetonitrilom (**preglednica 6**).

Največja protimikrobna aktivnost je bila izmerjena v frakcijah med 56. in 61. minuto. Izmerjena aktivnost frakcij F_{1+2} in F_{4+5} je bila v območju 10^3 – 10^4 AU/mg, kar pomeni, da je bila 10 do 100- krat nižja kot izmerjena aktivnost v frakciji F_3 , v kateri je bila specifična aktivnost $5,1 \times 10^5$ AU/mg (**preglednica 7**). Po ločevanju ekstrakta SPE na RP-HPLC, je bil izkoristek frakcije F_3 nizek (0,09 %), vendar podoben kot pri drugih raziskavah čiščenja bakteriocinov. Izkoristki, o katerih so poročali pri čiščenju drugih gasericinov vrste *L. gasseri*, kot so gasericin T (Kawai in sod., 2000), gasericin KT7 (Zhu in sod., 2000), acidocina LF221 A in LF221 B (Matijašić in sod., 1998), so bili prav tako manjši od 1 % (**preglednica 5 in 6**).

Zaradi potenciala bakteriocinov za industrijsko uporabo je smiselno posvetiti dovolj pozornosti tudi optimizaciji postopkov čiščenja, tako da je izplen očiščenih bakteriocinov čim večji. Za industrijsko uporabo je pomemben razvoj primernih gojišč (Trinetta in sod., 2008). Da dosežemo potrebno stopnjo čistosti bakteriocinov, so potrebni številni koraki, pri vsakem od njih pa pride do izgub v količini, lahko pa tudi v specifični aktivnosti bakteriocinov. Lahko se zgodi, da bakteriocinske molekule med čiščenjem izgubijo aktivnost. Zacharof in sod. (2013) so poročali o rasti mikroorganizmov v posebnih gojiščih z nizkomolekularnimi sestavinami ter o učinkoviti uporabi metod ultra- in nanofiltracije. Alternativna rešitev za zmanjšanje števila korakov čiščenja je rast seva v kemijsko definiranih gojiščih, ki ne vsebujejo različnih proteinov in peptidov, običajnih v drugih gojiščih (Khan in sod., 2013).

5.2.1 Identifikacija bakteriocinov

Po zadnjem koraku čiščenja smo pridobljeno frakcijo F_3 analizirali z MALDI-TOF. Zaznali smo tri peptide z različnimi molekulskimi masami (4225,1 Da, 4761,8 Da in 5512,8). Peptid z molekulsko maso 4761,8 Da je v spektru MS prevladoval po ionski intenziteti, ki je bila približno 10-krat večja v primerjavi s preostalima peptidoma v frakciji F_3 , pridobljeni po zadnjem koraku čiščenja z RP-HPLC (**slika 11**). Za ta peptid smo z masno spektrometrijo (LC-MS/MS) pridobili tudi aminokislinsko sekvenco (**slika 12**). Primerjava aminokislinske sekvence izoliranega bakteriocina s podatki za znane proteine se je ujemala z aminokislinsko sekvenco peptida GatX, izpeljano iz nukleotidnega zaporedja (Kawai in sod., 2000). Pri tem je bil izvzet N-terminalni del

prepeptida GatX, dolg 17 AK. GatX je komplementarni peptid dvo-peptidnega bakteriocina gasericina T. Z metodo LC-MS/MS smo ugotovili 46 od skupno 48 aminokislin tega peptida (96 %). Torej le 2 aminokislini nista bili zaznani, in sicer asparagin (Asn) in lizin (Lys). Analiza z masno spektrometrijo je pokazala, da je aminokislinska sekvenca izoliranega peptida homologna sekvenci domnevnega aktivnega peptida gasericina K7 B (Gas K7 B_AcP), izpeljani iz nukleotidnega zaporedja odgovarjajočega gena, ter peptida GatX, komplementarnega peptida gasericina T (Kawai in Saito, 2011). Analiza nukleotidnega zaporedja gena (Gas K7 B_AcP) sicer pokaže, da ima prepetid še N-terminalno zaporedje 17 aminokislin, ki pa se odstranijo med izločanjem bakteriocinov iz celice, kar je skupna lastnost bakteriocinov razreda II (Allison in sod., 1994).

Kawai in sod. (2000) sicer iz kulture seva *L. gasseri* SBT2055, ki proizvaja dvo-komponentni bakteriocin gasericin A, niso izolirali peptida GatX, za katerega nosi zapis gen *GatX*, ampak samo peptid, ki ima zapis na genu *GatA* istega genskega sklopa. Zato so GatX opisali kot komplementarni peptid, ki nima protimikrobne aktivnosti, za razliko od GatA, ki je aktiven. Sklepanje Kawai in sod. (2000), da je GatX peptid komplementarni peptid brez protimikrobne aktivnosti, je temeljilo tudi na primerjavi njegove sekvence s sekvenco LafF - komplementarne komponente bakteriocina laktacina F, ki je 64 % homologna z GatX. Peptid GatA, aktivno komponento gasericina T, pa so uspeli izolirati in raziskati. Molekulska masa GatA je bila ocenjena z metodo SDS-PAGE na 5400 Da (Kawai in sod., 2000). Proizvodnjo gasericina T so do sedaj dokazali pri sevih *L. gasseri* SBT2055 in *L. gasseri* LA158 (Kawai in sod., 2006). V raziskavah Lakshminarayanan in sod. (2013) so iz vzorcev blata izolirali številne seve, ki so izražali protimikrobno aktivnost. Potrdili so, da so med izoliranimi sevi trije predstavniki vrste *Lactobacillus gasseri*, ki proizvajajo bakteriocine, in sicer *L. gasseri* EM081-BC-T3-1, *L. gasseri* EM315-BC-T6-1 in *L. gasseri* EM301-BC-T3-1. Za sev *L. gasseri* EM081-BC-T3-1 so s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za gasericin T dokazali, da sev proizvaja ta bakteriocin, kar je bilo potrjeno tudi s sekvenciranjem. Pri ostalih dveh sevih so potrdili, da proizvajata različico gasericina A. Razlika je bila le v eni aminokislini. Z masno spektrometrijo so ugotovili, da je molekulska masa različice gasericina A 5683 Da, medtem ko je molekulska masa gasericina A 5652 Da.

Čeprav je raziskovanje izražanja genov za bakteriocine *L. gasseri* K7 pokazalo, da se izražajo vsi geni bakteriocinskega kompleksa gasericinov K7, smo iz gojišča kulture K7 uspeli izolirati le en peptid (Gas K7 B_AcP), ostalih treh (Gas K7 B_CP, Gas K7 A_CP, Gas K7 A_AcP) pa ne. Mogoče je, da so druge frakcije vsebovale še kakšno od drugih komponent bakteriocinskega kompleksa, vendar jih nismo odkrili in analizirali z masno spektrometrijo, ker je bila njihova aktivnost nizka. Možnih razlag za nizko aktivnost ostalih komponent bakteriocinov, ki jih zaradi tega nismo uspeli izolirati, je več. Med njimi velja omeniti neaktivnost zaradi posttranslacijske modifikacije, izgubo aktivnosti med kromatografskimi stopnjami, izgubo aktivnosti zaradi ločitve komplementarnih komponent (za aktivnost sta včasih potrebni obe), nedokončano biosintezo ali nepopolni transport iz celic. Sklepamo, da bi lahko boljši postopek čiščenja, na primer z vključitvijo kationske izmenjevalne kromatografije, omogočil izolacijo še kakšnega aktivnega peptida.

Z izolacijo aktivnega peptida Gas K7 B_AcP smo prispevali k poznavanju bakteriocinov vrste *Lactobacillus gasseri*. Sevi te vrste se uporabljajo ne samo pri fermentaciji hrane ampak predvsem kot probiotiki. Medtem ko je vrsta *L. gasseri* dobro raziskana v smislu probiotičnega delovanja, pa o vlogi bakteriocinov te vrste v prebavi človeka in njihovih interakcijah z mikrobioto in z gostiteljem še ni dovolj podatkov.

5.3 PROTIMIKROBNI SPEKTER IZOLIRANEGA AKTIVNEGA PEPTIDA GASERICINA K7 B

Protimikrobni spekter frakcije F₃, ki je vsebovala aktivno komponento gasericina K7 B, smo testirali proti različnim predstavnikom rodov *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* in *Clostridium* s »spot-test«-om na agarju. Hkrati z aktivno komponento Gas K7 B smo testirali tudi nevtralizirani supernatant in kulturo seva K7. Test je pokazal čiste inhibicijske cone pri indikatorskih sevih iz rodu *Lactobacillus* z izjemo *L. gasseri* CCDM 214. Na podlagi teh rezultatov sklepamo, da je inhibicija laktobacilov odvisna od seva. Rast vseh predstavnikov rodov laktokokov, enterokokov in klostridijev je aktivna komponenta Gas K7 B inhibirala.

Nismo pa zaznali inhibicije sevov vrst *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus thermophilus* in *Listeria innocua* ne z aktivno komponento Gas K7 B in ne s supernatantom kulture K7. Rezultati inhibicije indikatorskih sevov s kulturo K7, nevtraliziranim supernatantom kulture K7 in izolirano komponento Gas K7 B so se večinoma ujemali z nekaj izjemami. Seva *Staphylococcus aureus* IM 132 in *Listeria innocua* LMG 11387 je inhibirala le kultura seva K7, ne pa supernatant in izoliran aktivni peptid (**preglednica 8**). Domnevamo, da je za pojav inhibicije proti omenjenima indikatorskima sevoma odgovoren kakšen drug protimikrobni dejavnik in ne bakteriocin. Mlečnokislinske bakterije namreč proizvajajo poleg bakteriocinov še številne druge protimikrobne snovi, kot so organske kisline (mlečna in očetna), maščobne kisline in H₂O₂ (De Vuyst in Leroy, 2007; Gillor in sod., 2008). Sev *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 20481 pa je inhibiral le izolirani aktivni peptid Gas K7 B. Predvidevamo, da je bilo v supernatantu in v okolici kulture seva K7 premajhna koncentracija bakteriocina, ki bi inhibirala ta indikatorski sev. V prejšnjih študijah je sev *L. gasseri* K7 prav tako izkazal protimikrobno delovanje proti različnim indikatorskim sevom iz rodov: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria* in *Clostridium* (Matijašić in Rogelj, 1999, 2000), ni pa bilo dokazano, kateri peptid bakteriocinskega kompleksa in s kakšnim deležem prispeva k protimikrobni aktivnosti seva K7. Kawai in sod. (1997) so za gasericin T dokazali, da inhibira tudi posamezne patogene mikroorganizme, kot so sevi vrst *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* in *Staphylococcus aureus*. V študiji Lakshminarayanan in sod. (2013) so osamili več sevov vrste *L. gasseri*. Dokazali so, da ti sevi proizvajajo predvsem gasericin T in različico gasericina A. Testirani bakteriocini so izražali ozek spekter bakteriocinske aktivnosti proti indikatorskim sevom, večinoma proti sevom rodu *Lactobacillus*.

5.4 VPLIV SEVA *L. gasseri* K7 IN AKTIVNEGA PEPTIDA GASERICINA K7 B NA CELICE Caco-2

Bakterije ter njihovi metaboliti delujejo kot stimuli za različne tipe celičnih linij, kot so Caco-2, HT-29 in T-84 (Remus in sod., 2011; Marzorati in sod., 2011). V naši raziskavi vpliva seva *L. gasseri* K7 na črevesni epitelij smo izbrali celično kulturo Caco-2, ki je po 21-dnevni inkubaciji od nasaditve celic na membrane s porami v velikosti 0,4 μm , odražala stanje polariziranega epitelijskega črevesu odraslega človeka. Ker so v raziskavah Briske-Anderson in sod. (1997) ugotovili, da so tesni stiki pri celicah Caco-2 najbolj stabilni med 31. in 36. pasažo, smo tudi v naši raziskavi za merjenje TEER in opazovanje razporejanja proteinov tesnih stikov, uporabili celice Caco-2 med 31.-34. pasažo.

Nekateri sevi rodu *Lactobacillus* imajo sposobnost vplivanja na tesne stike ter na integriteto monosloja Caco-2, kar so v dosedanjih raziskavah ugotavljali z merjenjem transepitelijske električne upornosti (TEER) (Eun in sod., 2010; Klingberg in sod., 2005; Remus in sod., 2011; Wells, 2011). V naši študiji smo za porušenje tesnih stikov celic Caco-2 uporabili PDB. O vplivu te kemikalije na tesne stike celic Caco-2 so poročali že predhodni raziskovalci (Karzewski in sod. 2010; Vermeulen in sod., 2011). PDB namreč preko PKC spodbudi paracelično hiperpermeabilnost (Vermeulen in sod., 2011). Testirali smo vpliv različnih koncentracij PDB na TEER celic Caco-2: 1, 5, 25 in 50 μM . Ker PDB v koncentraciji 1 μM , ki so jo v svoji raziskavi uporabili Karzewski in sod. (2010), ni statistično značilno vplival na padec TEER celic, smo izbrali koncentracijo 25 μM . Ta koncentracija sicer ni statistično značilno bolj vplivala na padec vrednosti TEER v primerjavi s 5 μM , je pa značilno vplivala na prerazporejanje proteinov tesnih stikov, kakor je bilo razvidno iz rezultatov konfokalnega mikroskopiranja (rezultati niso prikazani). Vpliv seva *L. gasseri* K7 na TEER, v odvisnosti od koncentracije bakterijskih celic, ter vpliva na s PDB porušeno integriteto epitelijskega monosloja, smo proučevali s pomočjo: merjenja TEER, ugotavljanja prerazporejanja proteinov tesnih stikov (okludin in ZO-1) s konfokalnim mikroskopiranjem ter ovrednotenjem imunskega odziva celic Caco-2 z merjenjem izločenega IL-8. Povišanje TEER pod vplivom testnega seva laktobacilov je bilo pogojeno s koncentracijo in časom tretiranja. Tako smo samo pri koncentraciji seva K7 100 KE/Caco-2 zabeležili

značilno povečanje TEER po 3 in 4,5 h inkubiranja, medtem ko koncentraciji 10 KE/Caco-2 in 1000 KE/Caco-2 nista statistično značilno vplivali na TEER (**slika 13**). Za sev *Lactobacillus gasseri* LF221 je Fajdiga s sod. (2006) dokazala, da v testiranih koncentracijah sev ni imel sposobnosti zvišati TEER monosloja celične kulture Caco-2. Na podlagi teh dveh raziskav sklepamo, da je sposobnost vplivanja na TEER odvisna od seva, ne samo od vrste. Za sev K7 v koncentraciji 100 KE/Caco-2, dodan celicam istočasno s PDB, smo dokazali, da je sposoben statistično značilno zadržati padec TEER v primerjavi s TEER celic, ki so bile tretirane samo s PDB (**slika 15**). Karzcewski in sod. (2010) so za sev *L. plantarum* WCFS1 prav tako dokazali, da je sposoben zadržati padec TEER s predhodno inkubacijo seva v koncentraciji 100 KE/Caco-2 pred dodatkom PDB. V naših raziskovanjih smo testirali obe kombinaciji: inkubacija celic Caco-2 z laktobacili 6 h pred dodatkom PDB (**slika 16**) in tretiranje Caco-2 istočasno s sevom K7 in PDB. Sev je zadržal padec TEER samo ob istočasnem inkubiranju seva K7 in PDB.

V zadnjem času so začeli raziskovati tudi morebitni neposredni vpliv bakteriocinov na barierno funkcijo in imunski odziv celičnih modelov črevesnih celic. O'Callaghan in sod. (2012) so dokazali, da se je ob inkubiranju seva *Lactobacillus salivarius* UCC118 s celicami Caco-2 statistično značilno povečalo izražanje genov operona, ki je odgovoren za proizvodnjo bakteriocina Abp118. Miyauchi in sod. (2012) so dokazali, da mutanta seva UCC118, ki ne proizvaja bakteriocinov, bolj uspešno zadrži zmanjšanje TEER, povzročeno s H₂O₂, kot sev, ki proizvaja bakteriocine. Zaradi teh rezultatov so raziskovalci predpostavili, da proizvodnja bakteriocinov zmanjša pozitivni vpliv laktobacilov na barierno zaščito. V naši raziskavi smo vzorčili gojišče na apikalni strani celic Caco-2, inkubiranih s sevom K7. Vzorčili smo v času največjega povišanja TEER in ob koncu preskusa, ko se je TEER že znižala. Naredili smo test za protimikrobno aktivnost na mikrotiterskih ploščah, vendar aktivnosti nismo ugotovili v nobenem vzorcu (rezultati niso prikazani).

Očiščena aktivna komponenta gasericina K7 B v treh različnih koncentracijah (2,5 µg/mL, 5 µg/mL in 10 µg/mL) ni vplivala na TEER monosloja celic Caco-2 (**slika 14**). Tudi v primeru hkratnega dodatka PDB in peptida Gas K7 B pri nobeni od treh koncentracij nismo izmerili statistično značilne spremembe vrednosti TEER (**slika 17**).

Maher in McClean (2006) so na celični kulturi Caco-2 proučevali vpliv protimikrobnih peptidov na TEER. Med proučevanimi peptidi so bili nisin A, galidermin, magainin I, magainin II in melitin. Dokazali so, da je le melitin vplival na TEER, in sicer je povečal paracelično propustnost in tako vplival v smeri znižanje TEER. Nasprotno so s študijo Di Cagno in sod. (2010) dokazali, da bakteriocin plantaricin A (PlnA) v koncentraciji 2,5 µg/ml zviša TEER monosloja Caco-2 celic, tako da zviša TEER. Ni mogoče izključiti, da bi gasericin K7 B v višjih koncentracijah deloval podobno kot bakteriocin PlnA, ali bi celo negativno vplival na TEER celic Caco-2. Zaradi omejene količine bakteriocinov, ki smo jih uspeli pridobiti s čiščenjem, učinkovanja bakteriocina v višjih koncentracijah nismo mogli preskusiti. V omenjenih primerih je potrebno upoštevati, da so preskušeni bakteriocini različnega izvora in imajo različne tako fizikalno-kemijske značilnosti kot tudi funkcije ter tako posledično različen vpliv na prokariotske in evkariontske celice. Če poudarimo primer PlnA, ki je podrobno preučen bakteriocin seva vrste *Lactobacillus plantarum*, ter deluje kot feromon pri mehanizmu »quorum sensing«. V raziskavi delovanja PlnA, opravljeni na celicah hipofize podgan, je bilo namreč dokazano, da PlnA preferenčno permeabilizira rakaste celice v primerjavi z normalnimi celicami. Torej je dokazano, da ima PlnA pozitiven vpliv na evkariontske celice.

Objavljenih je veliko raziskav o proteinih tesnih stikov v povezavi s TEER epitelijskih črevesnih celic. Raziskovalci so že dokazali, da probiotiki neposredno vplivajo na epitelijsko barierno funkcijo preko vpliva na strukture tesnih stikov. Izbrani sevi vrst *S. thermophilus* in *L. acidophilus* lahko povišajo TEER in zmanjšajo permeabilnost celic HT-29 in Caco-2 (Ohland in sod., 2010). Seva iz omenjene raziskave sta sprožila aktivacijo okcludina in ZO-1, kar se je pokazalo v povečanemu deležu fosforiliranih proteinov, brez značilne razlike v skupni količini omenjenih proteinov. Za opazovanje morfoloških sprememb tesnih stikov v črevesnih epitelijskih celicah smo uporabili konfokalno mikroskopiranje, kakor raziskovalci v nekaterih predhodnih raziskavah (Ma in sod., 2004; Karzewski in sod., 2010; Yu in sod., 2012). Med inkubacijo seva K7 s celicami Caco-2 smo celice fiksirali v času, ko je bila TEER najvišja, torej po 3 urah inkubacije celic Caco-2 s sevom v koncentraciji 100 KE/Caco-2. V fiksiranih vzorcih smo za tem imunofluorescenčno označili proteine tesnih stikov, okcludina in ZO-1.

Ugotovili smo, da je v vzorcih celic, tretiranih s PDB, povečana koncentracija označenih proteinov izven membrane celic, tako za protein okludin kot tudi ZO-1. Pri celicah, tretiranih s sevom K7 in PDB, ta pojava nista bila tako izrazita (**slika 20** in **21**). V številnih študijah so raziskovali povezavo med uravnavanjem TEER s probiotičnimi bakterijami ter izražanjem proteinov tesnih stikov. *L. acidophilus* ATCC4356 je povzročil povišanje TEER monosloja Caco-2, ki so ga raziskovalci povezali s povečanim izražanjem številnih genov, povezanih z izražanjem proteinov tesnih stikov (Anderson in sod., 2010). Povišanje TEER pri celičnih kulturah Caco-2 in HT-29 s sevom *L. plantarum* MB452 je odvisno od fosforilacije proteinov citoskeleta in tesnih stikov. Študija *in vivo* na zdravih prostovoljcih, ki so uživali sev *L. plantarum* WCFS1, je pokazala, da sev spodbudi reorganizacijo proteinov tesnih stikov v epitelijskih celicah dvanajstnika. Sev je namreč povečal lokalizacijo imunofluorescenčno označenih proteinov okludina in ZO-1 v epitelijskih tesnih stikih biopsijskih vzorcev (Karczewski in sod., 2010). Mehanizem signalizacije laktobacilov, ki vodi v spremembo tesnih stikov ter tako vpliv na uravnavanje TEER, še ni v celoti pojasnjen. Zaključki študij *in vitro* z agonistom TLR2 nakazujejo, da so v signalizacijo vključene specifične izoforme PKC. Lokalizacija okludina v tesnih stikih je regulirana s fosforilacijo na večjih mestih preko tirozinske kinaze c-Yes ali PKC (Ohland in sod., 2010). Aktivacija določenih izoform PKC lahko povzroči sproščanje zalog kalcija, kar vpliva na prerazporeditev proteinov in propustnost tesnih stikov (Cario in sod., 2004). Torej je sestavljanje tesnih stikov, TEER in lokalizacija okludina regulirana preko fosforilacije. Na primeru okludina so razložili, da v homeostazi pri okludinu poteka intenzivna fosforilacija na ostankih Ser in Thr, medtem ko je fosforilacija na ostanku Tyr vzdrževana na minimumu. Takšen okludin je lociran v tesnih stikih. Pri motnjah delovanja tesnih stikov, do katerih pride pod vplivom raznih dražljajev, se okludin defosforilira na Ser/Thr delu, kar povzroči prerazporeditev tega proteina iz membrane v citoplazmo. Natančna vloga fosforilacije Tyr ostanka še ni dobro pojasnjena, vendar predvidevajo, da povzroči slabšo interakcijo med okludinom in proteini ZO-1, kar vodi do prekinitve tesnih stikov (Martinez in sod., 2012). Internalizacijo proteinov tesnih stikov so dokazali v poskusih inkubacije celic v gojišču z nizko vrednostjo Ca^{2+} ali v gojišču brez Ca^{2+} , kar je povzročilo internalizacijo tako adherentnih kot tudi tesnih stikov. Kulture epitelijskih celic so izgubile sposobnost barierne funkcije zaradi redukcije Ca^{2+} ,

potekala je namreč klatrinsko posredovana endocitoze membranskih veziklov. Endocitoza v obeh primerih, tako pri pomanjkanju kalcija kot tudi tretiranju s citokini, vodi do reorganizacije aktina in aktivacije krčljivosti miozina. Periferni aktinski obroči se skrči preko miozina, kar povzroči internalizacijo proteinov (Capaldo in Nusrat, 2009). Spremembe v barierni funkciji se dogajajo preko MLC-kinaze (MLCK). MLCK je Ser-Thr kinaza, na katero vpliva Ca^{2+} -kaldmodulin. Fosforilacija MLC vodi v konformacijske spremembe, kar povzroči krčenje aktinsko-miozinskega kompleksa, to pa vodi endocitozo in v epiteljsko barierno disfunkcijo. Provnetni faktorji, kot so npr. TNF in produkti bakterij, so glavni dejavniki, ki povzročijo internalizacijo proteinov ZO-1 in okludina z endocitozo (Martinez in sod., 2012). V našem primeru je pojav internalizacije proteinov okludina in ZO-1 sprožil PDB, ki je dokazano aktivator PKC. Pojav imunooznačenih proteinov tesnih stikov ZO-1 v citoplazmi, ki smo jih opazili v naši raziskavi, so že opisali v raziskavi Yu in sod. (2012). Celice Caco-2 so okužili s sevom *Salmonella* Typhimurium SL1344 in po končani inkubaciji imunofluorescenčno označili proteine tesnih stikov. Na slikah je bila vidna fluorescenca, ki je difundirala v citoplazmo, kar pomeni, da so označeni proteini tesnih stikov difundirali v citoplazmo. Difundiranje v citoplazmo pod vplivom PDB smo v naši raziskavi opazili tako pri označenem proteinu okludinu kot tudi ZO-1. ZO-1 se namreč izraža in razporeja skupaj z okludinom v vseh celicah, ki tvorijo tesne stike. N-terminalni del proteina ZO-1 se povezuje z okludinom in ZO-2, medtem ko se C-terminalni del povezuje s citoskeletom (Clarke in sod., 2000).

5.5 IMUNOMODULATORNA AKTIVNOST SEVA *L. gasseri* K7 TER IZOLIRANEGA AKTIVNEGA PEPTIDA GASERICINA K7 B

Dokazano je bilo, da laktobacili sevno specifično vplivajo imunomodulatorno na celice Caco-2 (Remus in sod., 2011). V naših raziskavah smo preverili vpliv seva *L. gasseri* K7 na količino izločenega IL-8. Ugotovili smo, da je bila ob značilnem padcu TEER, povzročenem s PDB, statistično značilno povečana tudi količina izločenega IL-8 v gojišču. Pri tretiranju Caco-2 celic s K7 in PDB hkrati so rezultati pokazali, da se statistično značilno zmanjša količina izločenega IL-8 istočasno, kot se statistično značilno poveča količina izločenega IL-8 v gojišču ob tretiranju celic s samim PDB (**slika 22**). V raziskavi Fajdige in sod. (2006) so dokazali, da inkubacija celic Caco-2 s sevom *L. gasseri* LF221 hkrati z okužbo s *S. enteritidis* zavre izločanje IL-8. V raziskavah Yu in sod. (2012) so podobno dokazali, da je sev *Lactobacillus amylophilus* D14 ublažil zmanjšanje celične integritete, povzročene zaradi patogenov (*Escherichia coli* K88 in *Salmonella* Typhimurium SL1344). Podobno kot v primeru našega seva *L. gasseri* K7, je proučevani sev zmanjšal izločanje IL-8. Zhang in sod. (2005) so raziskovali sposobnost seva *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), da zniža izločanje IL-8, ki ga sproži citokin TNF- α . Pokazalo se je, da sev LGG tudi brez TNF- α sproži povečano izločanje IL-8 iz celic Caco-2. Dokazano je bilo, da so citokini sposobni direktno vplivati na strukturo tesnih stikov epitelijskih celic preko različnih signalnih poti (Capaldo in Nusrat, 2009). Rezultati naše raziskave kažejo na sposobnost seva K7, da zmanjša izločanje IL-8 ob hkratni inkubaciji s PDB. To lahko povežemo z zmožnostjo seva, da prepreči prerazporejanja proteinov okludina in ZO-1 v citoplazmo zaradi vpliva PDB. Ker izolirana komponenta Gas K7 B ni imela vpliva na TEER celic Caco-2, nismo ovrednotili izločanja IL-8 med inkubiranjem celic Caco-2 z različnimi koncentracijami izoliranega peptida.

V naslednjem sklopu smo raziskali vpliv izoliranega peptida Gas K7 B na imunske celice. Povod za naše študije so bile raziskave Meijerincka in sod. (2010) ter Hemert in sod. (2010), ki so raziskovali imunski odziv dendritskih celic na modelni mikroorganizem *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Iskali so povezavo med količino IL-10 in IL-12, ki so jih izločale dendritske celice po stimulaciji z različnimi sevi *L. plantarum* in sestavo genoma teh sevov. Identificirali so 8 genov, ki so bili vpleteni v

modulacijo dendritskih celic s citokini. Šest od teh genov je bilo odgovornih za produkcijo ali izločanje bakteriocinov - plantaricinov. Dejanski vpliv pa so dokazali z delecijско mutanto seva *Lactobacillus plantarum*, ki ne proizvaja bakteriocinov. Ta je izzvala izločanje večjih količin protivnetnega citokina IL-10 pri dendritskih celicah kot sev, ki proizvaja bakteriocine.

Za sev *L. gasseri* K7 je Hacinova (2010) že dokazala, da zmanjša izločanje glavnih provnetnih citokinov IL-6, IL-8 in TNF- α , izzvano z LPS na modelni celični kulturi makrofagov. Ni pa še raziskano, katere celične komponente ali metaboliti so odgovorni za protivnetno delovanje. V naši raziskavi smo z analizo glavnih provnetnih citokinov (IL-1 β , IL-6, IL-8 in TNF- α) preverili imunomodulatorni vpliv očiščene aktivne komponente gasericina K7 B, ki ga proizvaja sev K7, ter posledično možnost povzročitve vnetnega odziva *in vitro* na celični liniji THP-1. Za ugotavljanje vpliva seva K7 na izločanje citokinov je Hacinova (2010) uporabila monocitno celično linijo THP-1. Diferencirane celice THP-1 so po obnašanju bolj podobne preobraženim makrofagom in so dober model za *in vitro* proučevanje delovanja makrofagov. Diferenciacijo monocitov THP-1 v makrofage najpogosteje povzročimo z dodatkom PMA, ki spodbudi diferenciacijo monocitov v makrofage, ki so se pritrdili na dno polistirenske plošče. Za vrednotenje izločenih citokinov je Hacinova (2010) izbrala metodo pretočne citometrije (BD CBA), kjer je dodajala vzorcu mešanico različnih populacij lovilnih kroglic z različnimi intenzivnostmi fluoresciranja, pri čemer je vsaka od njih prekrita s specifičnimi protitelesi za enega od tarčnih citokinov. Citokine je merila tudi s testom ELISA. Za sev K7 je dokazala, da ni povzročil povečanja koncentracije pro-vnetnih citokinov (IL-8, IL-6 in TNF- α), opazila pa je povečanje IL-1 β , ki je mediator lokalnega vnetja in lahko povzroči proliferacijo celic B. Dodatek LPS iz *E. coli* O111:B4 je povzročil statistično značilno povišanje koncentracije IL-8, ob dodatku seva K7 pa so zaznali statistično značilno zmanjšanje koncentracije IL-8. Pri IL-6 in TNF- α se je njuna koncentracija povišala ob stimulaciji z LPS, ob stimulaciji z LPS in sevom K7, pa se je koncentracija citokina statistično značilno zmanjšala. V naših preskusih sposobnosti seva K7, da zmanjša količino z LPS izzvanih provnetnih citokinov, smo dobili rezultate, ki so primerljivi s predhodnimi (Hacin, 2010). Sev K7 smo uporabili kot kontrolo pri testu ELISA, uporabljenem za ovrednotenje vpliva izoliranega peptida na izločanje

provnetnih citokinov celic THP-1. Rezultati meritev citokinov ob dodatku izoliranega peptida Gas K7 B so pokazali, da gasericin K7 B v koncentraciji 10 µg/ml ni značilno vplival na izločanje citokinov celic THP-1. Prav tako ni vplival na spremembo količine izločenih citokinov ob istočasni izpostavitvi celic LPS. Kar pomeni, da LPS in aktivna komponenta gasericina K7 B nimata sinergističnega vpliva na izločanje provnetnih citokinov pri celični kulturi THP-1 (**slika 23**).

V naših raziskavah smo uporabili modelni celični kulturi Caco-2 in THP-1. Upoštevati moramo omejitve metode *in vitro*, ki le do neke mere nakazujejo, kaj se dejansko dogaja *in vivo*. Za raziskovanje interakcij med gostiteljem in mikrobioto uporabljajo tudi biopsijske vzorce črevesne sluznice. Slaba stran takega modela je, da so vzorci ponavadi pridobljeni iz posameznikov, ki so razvili določeno bolezen, kar pa prikazuje patološke razmere v tem okolju (Marzorati in sod., 2011). Modela, ki bi simultano odražal številne parametre, ki so pomembni za naselitev in delovanje mikroorganizmov, kot so stres, zaradi sil, ki so posledica prehoda hrane, mikrobne interakcije, mikroaerofilne razmere ob steni črevesa, interakcije mikrobi-gostitelj in druge, do sedaj še niso razvili. Prednost poenostavljenih modelov *in vitro* pa je, da so dobro kontrolirani, da omogočajo raziskovanje mikrobne kolonizacije daljše časovno obdobje in so enostavno dostopni (Remus in sod., 2011).

Do sedaj je bilo izoliranih veliko različnih bakteriocinov laktobacilov, ki se razlikujejo po sledečih lastnostih: velikost, struktura, način delovanja, protimikroben potencial, mehanizmi imunosti in tarčni celični receptorji (De Vuyst in sod., 2007; Dobson in sod., 2012). Poleg relativno dobro raziskanega delovanja bakteriocinov v hrani, kot biokonzervansov, imajo bakteriocini tudi številne lastnosti, zaradi katerih imajo potencial kot alternativa antibiotikom. Te lastnosti vključujejo moč/aktivnost, nizko toksičnost, možnost široko- ali ozkospektralnosti ter možnost proizvodnje *in situ*. Opirajo pa se tudi številne možnosti izboljšav proizvodnje z bioinženiringom (Cotter in sod., 2013). Potencial bakteriocinov za uporabo v hrani, kozmetični in farmacevtski industriji so v zadnjih letih intenzivno proučevali, podatkov o njihovem vplivu na evkariontske celice in vlogi v prebavilih, vključno z varnostjo uporabe pri ljudeh, pa je malo. Raziskave o morebitni toksičnosti bakteriocinov in o potencialnem preventivnem delovanju pri preprečevanju bolezni so ključne za njihovo uporabo v prihodnje. V

zadnjem času so dokazali, da imata gasericin A in gasericin T potencial uporabe kot konzervansa v živilski industriji (Arakawa in sod., 2009). Uporaba bakteriocinov kot konzervansov ali pri podpori zdravljenju, tudi kot možna alternativa za antibiotike, zahtevajo raziskave vplivov bakteriocinov na evkariontske celice in posledično na zdravje človeka. Raziskava aktivnega peptida gasericina K7 B, ki smo ga uspeli izolirati v tem delu, kakor tudi preskusiti na celičnih modelih, je ena prvih te vrste. Rezultati, dobljeni v naši raziskavi, potrjujejo potencial seva *L. gasseri* K7 za varno uporabo kot probiotika.

6 SKLEPI

- Z metodo RT-qPCR smo dokazali, da pri rasti seva v tekočem gojišču MRS pri 37 °C pride do izražanja vseh analiziranih genov gasericina K7 A in gasericina K7 B po 4 h. Protimikrobno aktivnost izločenih bakteriocinov smo v gojišču prvič zaznali po 4 urah, po 8 h pa je dosegla maksimalno vrednost.
- Ko je bil sev *L. gasseri* K7 izpostavljen različnim dejavnikom, kot so kisel pH (pH=3), želodčne soli in pepsin, značilni za želodec, oziroma rahlo alkalni pH, žolčne soli in pankreatin, značilni za črevo, nismo izmerili protimikrobne aktivnosti v gojišču.

Rezultati, povzeti v prvih dveh sklepih, ne potrjujejo hipoteze, ki se je glasila, da sev *L. gasseri* K7 proizvaja bakteriocine tudi v simuliranih razmerah prebavnega trakta.

- Tretiranje celic Caco-2 s PDB (phorbol 12, 13-dibutyrate) je povzročilo prerazporejanje proteinov tesnih stikov (okludin in ZO-1) izven celične membrane. Če smo celice Caco-2 istočasno izpostavili PDB in sevu *L. gasseri* K7, pa je bil vpliv PDB na prerazporeditev proteinov tesnih stikov manj izražen. Ker smo raziskavo preusmerili na proteinski nivo, izražanja genov za omenjene proteine, kakor je bilo prvotno predvideno in omenjeno tudi v hipotezi, nismo merili.
- *L. gasseri* K7 je izkazal sposobnost povečanja transepitelijske električne upornosti (TEER) celic Caco-2 po 3 in 4,5 h skupnega inkubiranja, če smo ga celicam Caco-2 dodali v koncentraciji 100 KE/Caco-2. Razen tega je sev K7 (100 KE/Caco-2) tudi zmanjšal (po 3 in 4,5 h) padec TEER, povzročen s PDB, kadar je bil celicam Caco-2 dodan istočasno. Aktivni peptid gasericina K7 B v koncentracijah 2,5 µg/mL, 5 µg/mL in 10 µg/mL ni izkazal vpliva na TEER celic Caco-2.

Kakor je razvidno iz zgornjih dveh sklepov, smo hipotezo o vplivu *L. gasseri* K7 na črevesne epitelijske celice potrdili. Sev K7 je izkazal pozitivno delovanje, medtem ko izoliran peptid gasericina K7 B ni imel vpliva na celice Caco-2.

- Aktivna komponenta gasericina K7 B v koncentraciji 10 µg/ml ni izkazala učinka na koncentracijo izločenih tarčnih provnetnih citokinov (IL-1β, IL-6, IL-8 in TNF-α) v celičnih kulturah THP-1, modelu za makrofage.
- Modelne epiteljske celice Caco-2, izpostavljene sevu *L. gasseri* K7 in PDB, s katerim smo vplivali na medcelične stike v smislu zmanjšanja TEER, so izločale manjše količine IL-8 kot celice Caco-2, tretirane samo s PDB.

Zadnjo hipotezo, v kateri smo predpostavili, da bodo *L. gasseri* K7 in njegovi bakteriocini izkazali imunomodulatorni vpliv na epiteljske in/ali imunske celice, smo tako delno potrdili.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Lactobacillus gasseri je razširjena vrsta komezalnih bakterij, ki naseljuje mukozne niše človeka. Predstavniki te vrste so v uporabi kot probiotiki zaradi številnih probiotičnih lastnosti. *Lactobacillus gasseri* K7 je sev, izoliran leta 1996 iz blata dojenčka. Zaradi protimikrobne aktivnosti je postal zanimiv kot potencialen probiotični mikroorganizem. Njegove probiotične lastnosti so bile testirane *in vitro* ter *in vivo*. V preteklih raziskavah bakteriocinov seva *L. gasseri* K7 so se osredotočili na ugotavljanje protimikrobnega delovanja proti različnim bakterijam, v različnem okolju ter na genetsko karakterizacijo gasericinov K7. Glavni cilji raziskave, predstavljene v doktorski disertaciji, pa so bili izolirati protimikrobne peptide gasericinov A in B seva K7, ugotoviti protimikrobno aktivnost posameznih aktivnih komponent bakteriocinskega kompleksa seva K7 ter raziskati *in vitro* morebitne vplive bakteriocinov in seva K7 na črevesno barierno funkcijo in na imunski odziv gostitelja. Prav tako je bil naš namen razviti izolacijski protokol, po katerem bi dobili takšne količine bakteriocinov, ki bi zadostovale za nadaljnje raziskave njihovega delovanja tudi *in vitro* na celičnih modelih. Pretekle raziskave delov genoma, kakor tudi nedavno sekvenciranje celotnega genoma *L. gasseri* K7 so pokazali, da sev K7 vsebuje gene za 2 dvo-komponentna bakteriocina, ki so jih poimenovali gasericin K7 A (GenBank EF392861) in gasericin K7 B (GenBank AY307382). Operon gasericina K7 A sestavljajo 3 geni: gen za komplementarni peptid, gen za aktivni peptid ter gen za peptid imunosti. Na operonu za gasericin K7 B pa ležijo geni, ki nosijo zapis za akcesorni peptid, transportni peptid, komplementarni peptid, aktivni peptid ter protein imunosti. Rezultati ovrednotenja izražanja genov za bakteriocine K7 so pokazali, da se vseh 8 genov obeh gasericinov izraža med rastjo v gojišču MRS. Vpliv posameznih dejavnikov, ki so značilni za okolje prebavil človeka, smo preskusili tako, da smo sev K7 gojili v modificiranem gojišču MRS, ki so mu bile dodane želodčne soli, pepsin, žolčne soli ali pankreatin, ali pa so bile vrednosti pH nizke kot v kislem okolju želodca, oziroma rahlo alkalne, kot v črevesju. V prisotnosti žolčnih kislin in pri kislem pH sev ni rasel ali je celo odumiral, kar se je odrazilo tudi v odsotnosti protimikrobne aktivnosti. Z namenom ugotavljanja lastnosti bakteriocinskih peptidov, protimikrobnega spektra in

prispevka vsakega od bakteriocinov k protimikrobnemu delovanju smo se lotili izolacije bakteriocinskih komponent iz supernatanta kulture K7. Postopek je vključeval izsoljevanje proteinov z amonijevim sulfatom, nanos vzorca izsoljenih proteinov na trdne nosilce/kolone in ločevanje komponent vzorca s postopnim večanjem % acetonitrila. Sledilo je ločevanje proteinov z RP-HPLC. Frakcijo z največjo specifično protimikrobno aktivnostjo smo analizirali z LC-MS in z masno spektrometrijo MALDI-TOF, s pomočjo katerih smo pridobili podatke o aminokislinski sekvenci in molski masi izoliranega peptida (4761,8 Da). Analiza z masno spektrometrijo je pokazala, da je aminokislinska sekvenca izoliranega peptida homologna sekvenci domnevnega aktivnega peptida gasericina K7 B (Gas K7 B_AcP), izpeljani iz nukleotidnega zaporedja odgovarjajočega gena, ter peptida GatX, komplementarnega peptida gasericina T, ki so ga v prejšnjih raziskavah opisali kot neaktivnega. Izolirani peptid je izkazal širok spekter protimikrobne aktivnosti, ki zajema predstavnike rodov *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* in *Clostridium*. Aktivne komponente gasericina K7 A nismo uspeli izolirati, kljub temu da so rezultati RT-qPCR pokazali, da se odgovarjajoči geni izražajo. Morebitni vpliv seva K7 in izoliranega bakteriocinskega peptida na celice človeka smo testirali na celičnih kulturah Caco-2 (celični model enterocitov) in THP-1 (celični model monocitov). Možne vplive na epiteljsko barierno funkcijo smo proučevali z merjenjem transepiteljske električne upornosti (TEER). Dokazali smo, da je sev *L. gasseri* K7 v koncentraciji 100 KE/Caco-2 sposoben po 3 in 4,5 h inkubiranja zvišati TEER monosloja celične kulture Caco-2. Sev K7 v isti koncentraciji je tudi zadržal padec TEER, kadar smo medcelične stike porušili s forbol 12, 13-dibutiratom (PDB). Aktivna komponenta gasericina K7 B v nobeni od treh preskušanih koncentracij (2,5 µg/mL, 5 µg/mL in 10 µg/mL) ni pokazala značilnega vpliva na TEER monosloja Caco-2. Celice Caco-2 smo fluorescenčno označili s konjugiranimi protitelesi za okludin in ZO-1 in s konfokalnim mikroskopiranjem ovrednotili prerazporejanje proteinov tesnih stikov v času, ko smo opazili največje povišanja ali padec TEER. Sev K7 je zadržal prerazporejanje proteinov tesnih stikov (okludin, ZO-1) iz celične membrane v citoplazmo, kar je pokazala primerjava vzorcev, tretiranih s samim PDB ter PDB in sevom K7 hkrati. Z ovrednotenjem imunomodulatornega delovanja seva K7 na celice Caco-2, ki smo jim tretirali s PDB z namenom porušanja medceličnih stikov, smo ugotovili, da Caco-2 izločajo večjo

količino IL-8, kadar jih tretiramo samo s PDB, kakor kadar jim poleg PDB dodamo tudi sev K7. Z merjenjem provnetnih citokinov v gojišču z ELISA smo ovrednotili tudi imunomodulatorni učinek aktivne komponente gasericina K7 B na celično kulturo THP-1, ki je model makrofagov. Aktivni peptid v koncentraciji 10 µg/ml ni vplival na izločanje nobenega od tarčnih provnetnih citokinov (IL-1 β , IL-6, IL-8 in TNF- α). Prav tako pa ni pokazal sinergističnega vpliva z LPS na izločanje tarčnih provnetnih citokinov. Rezultati, dobljeni v naši raziskavi, potrjujejo potencial seva *L. gasseri* K7 za uporabo kot probiotika, vlogo samih bakteriocinov tega seva pri delovanju na gostitelja pa bo potrebno še raziskati.

7.2 SUMMARY

Lactobacillus gasseri is a bacterial species commonly detected in human mucous niches. Representatives of this species are often used as probiotics due to several probiotic properties. *Lactobacillus gasseri* K7 is an isolate from feces of a breast-fed infant. Due to its antimicrobial activity, origin and other characteristics it has become interesting as a potential probiotic microorganism. Its probiotic properties have been established *in vitro* and *in vivo*. Previous studies of *L. gasseri* K7 bacteriocins were focused on the identification of antimicrobial activity against a range of bacteria, in different environments and in genetic characterization of gassericsins K7. The main aims of the study presented in doctoral dissertation were to isolate antimicrobial peptides of gassericsins K7 A nad K7 B, to determine bacteriocin activity of individual active components of K7 bacteriocin complex and to examine *in vitro* the possible effects of bacteriocins and K7 strain on gut epithelial barrier function and host's immune response. Furthermore, we planned to develop an isolation protocol which would yield bacteriocins in the amounts sufficient for further studies of their activity, also *in vitro* on cell models. Previous studies of particular parts of the genome, as well as recent sequencing of the entire genome of *L. gasseri* K7 revealed two gene clusters encoding 2 two-component bacteriocins, named gassericin K7 A (GenBank EF392861) and gassericin K7 B (GenBank AY307382). Gassericin K7 A operon consists of 3 genes: gene for complementary peptide, gene for active peptide and immunity gene. Genes found on gassericin K7 B operon include those for accesory, transport, complementary, active and immunity peptides. The results of K7 bacteriocin genes' expression

experiments showed that all 8 target genes of both bacteriocins were expressed during growth in MRS broth. The influence of different factors that are specific for the human gut environment was tested by the growth of K7 strain in a modified medium MRS with added gastric salts, pepsin, bile salts or pancreatin, or with pH adjusted to low pH as typical for stomach environment, or slightly alkaline pH, such as in the intestine. The absence of growth or decrease of viable counts in the presence of bile acids and acidic pH resulted also in the absence of antimicrobial activity. In order to reveal the properties of bacteriocin peptides, antimicrobial spectrum and contribution of individual bacteriocins to antimicrobial activity, we carried out the isolations of bacteriocin components from the supernatant of K7 culture. The procedure included ammonium sulphate precipitation, solid phase extraction chromatography (SPE) and RP-HPLC. The fraction with the highest specific antimicrobial activity was analysed by LC-MS and by mass spectrometry MALDI-TOF in order to obtain the amino-acid sequence and molecular mass (4761.8 Da) of the isolated peptide. Mass spectrometry analysis revealed that the amino acid sequence of isolated peptide matched the deduced amino acid sequence of putative active peptide of gassericin K7 B (Gas K7 B_AcP) and GatX, a complementary peptide of gassericin T, previously supposed to have no antimicrobial activity. The isolated peptide showed a broad spectrum of antimicrobial activity, including the representatives of genera *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* and *Clostridium*. We haven't succeeded to isolate the active peptide of gassericin K7 A, despite the observed expression of respective genes.

The possible effect of K7 strain and isolated bacteriocin peptide on human cells was tested on cell cultures of Caco-2 (enterocytes cell model) and THP-1 (macrophage cell model). The possible effects on epithelial barrier function were studied by measurement of trans-epithelial electrical resistance (TEER). We demonstrated that *L. gasseri* K7 strain in concentration 100 CFU/Caco-2 was able to increase after 3 and 4,5 h co-cultivation, the TEER of the Caco-2 cell culture monolayer. The strain K7 was also able to reduce the decrease of TEER induced by phorbol 12, 13-dibutyrate (PDB). Active component of gassericin B tested at three concentrations (2.5 µg/mL, 5 µg/mL and 10 µg/mL) exerted no significant effect of TEER of Caco-2 monolayer. Caco-2 cells were fluorescently labeled with conjugated occludin and ZO-1 antibodies and examined for

eventual redistribution of tight junctions proteins at time point when the increase or decrease of TEER was the most notable. K7 strain reduced the redistribution of tight junctions proteins from cell membranes into cytoplasm, as was evident from the comparison between the samples treated with PDB only, or both, with K7 strain and PDB simultaneously. The evaluation of an immunomodulatory activity of K7 strain to Caco-2 cells treated with PDB with the aim to destruct the tight junctions, showed that Caco-2 cells secreted a larger amount of IL-8 when treated only with PDB, as if they were treated with PDB and K7 strain simultaneously. By the measurement of proinflammatory cytokines in the culture medium by ELISA, we also assessed the immunomodulatory effect of the active component of gassericin K7 B on the cell culture THP-1, which is a model of macrophages. The active peptide at a concentration of 10 µg/mL had no effect on the secretion of any of the target proinflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, IL-8 and TNF-α). Furthermore the synergistic effect of isolated peptide and LPS on production of tested proinflammatory cytokines wasn't observed. The results obtained in our study confirm the potential of the strain *L. gasseri* K7 for its use as a probiotic, while the role of bacteriocins of this strain themselves in the activity on the host remains to be further explored.

8 VIRI

- Aagaard K., Ma J., Antony K.M., Ganu R., Petrosino J., Versalovic J. 2014. The placenta harbours a unique microbiome. *Science Translational Medicine*, 6: e237, doi: 10.1126/scitranslmed.3008599: 6 str.
- Abbas B., Hayes T.L., Wilson D.J., Carr K.E. 1989. Internal structure of the intestinal villus: morphological and morphometric observations at different levels of the mouse villus. *Journal of Anatomy*, 162: 263-273.
- Allison G.E., Fremaux C., Klaenhammer T.R. 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *Journal of Bacteriology*, 176: 2235-2248.
- Anderson R.C., Cookson A.L., McNabb W.C., Park Z., McCann M.J., Kelly W.J., Roy N.C. 2010. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiology*, 10: e316, doi:10.1186/1471-2180-10-316, 10 str.
- Arakawa K., Kawai Y., Iioka H., Tanioka M., Nishimura J., Kitazawa H., Tsurumi K., Saito T. 2009. Effects of gassericins A and T, bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri*, with glycine on custard cream preservation. *Journal of Dairy Science*, 92: 2365-2372.
- Balciunas E.M., Martinez F.A.C., Todorov S.D., de Melo Franco B.D.G., Converti A., de Souza Oliviera R.P. 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32: 134-142.
- Bianchi M.A., Rio D.D., Pellegrini N., Sansebastiano G., Neviani E., Brighenti F. 2004. A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. *Letters in Applied Microbiology*, 39: 301-305.
- Briske-Anderson M.J., Finley J.W., Newman S.M. 1997. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine*, 214, 3: 248-257.

- Bron P.A., van Baarlen P., Kleerebezem M. 2012. Emerging molecular insight into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews*, 10: 66-78.
- Capaldo C.T., Nusrat A. 2009. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788, 4: 864-871.
- Cario E., Gerken G., Podolsky D.K. 2004. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology*, 127: 224-238.
- Clarke H., Marano C.W., Soler A.P., Mullin J.M. 2000. Modification of tight junction function by protein kinase C isoforms. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 41: 283-301.
- Corr S.C., Li Y., Riedel C.U., O'Toole P.W., Hill C., Gahan C.G.M. 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 7617-7621.
- Corr S. C., Hill C., Gahan C. G. M. 2009. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Advances in Food and Nutrition Research*, 56: 1-15.
- Cotter P.D., Ross P.R., Hill C. 2013. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews*, 11: 95-105.
- Di Cagno R., De Angelis M., Calasso M., Vincentini O., Vernocchi P., Ndagijimana M., De Vincenzi M., Dessi M.R., Guerzoni M.E., Gobbetti M. 2010. Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400: Induction of plantaricin A (PlnA) under co-cultivation with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and Caco-2 cells. *Proteomics*, 10: 2175-2190.
- Diep D. B., Straume D., Kjos M., Torres C., Nes I. F. 2009. An overview of the mosaic bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides*, 30: 1562-1547.

- De Man J.C., Rogosa M., Sharpe E. 1960. A medium for cultivation of *Lactobacilli*. Journal of Applied Bacteriology, 23: 130-135.
- De Vuyst L., Leroy F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 13: 194-199.
- Dobson A., Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. 2012. Bacteriocin production as a probiotic trait? Applied and Environmental Microbiology, 78: 1-6.
- Dziarski R., Jin Y., Gupta D. 1996. Differential activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1, ERK2, p38 and c-Jun NH₂-terminal kinase mitogen-activated protein kinases by bacterial peptidoglycan. Journal of Infectious Diseases, 174: 777-785.
- Eijsink V.G.H., Axelsson L., Diep D.B., Havarstein L.S., Holo H., Nes I.F. 2002. Production of class II bacteriocins of lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. Antonie van Leeuwenhoek, 81: 639-654.
- Eun C.S., Kim Y.S., Han D.S., Choi J.H., Lee A.R., Park Y.K. 2010. *Lactobacillus casei* prevents impaired barrier function in intestinal epithelial cells. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, 119: 49-56.
- Fajdiga S., Koninkx J. F. J. G., Tooten P. C. J., Marinšek Logar R. 2006. Interference of *Salmonella enteritidis* and *Lactobacillus* spp. with IL-8 levels and transepithelial electrical resistance of enterocyte-like Caco-2 cells. Folia Microbiologica, 51: 268-272.
- Fernandez M. F., Boris S., Barbes C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology, 94: 449-455.
- Galvez A., Abriouel H., Lopez R.L., Ben Omar N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. International Journal of Food Microbiology, 120: 51-70.

- Gillor O., Etzion A., Riley M.A. 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81: 591-606.
- Granger M., van Reenen C.A., Dicks L.M.T. 2008. Effect of gastro-intestinal conditions on the growth of *Enterococcus mundtii* ST4SA, and production of bacteriocin ST4SA recorded by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 123: 277-280.
- Hacin B. 2010. Mehanizmi probiotičnega delovanja izbranih laktobacilov človeškega in živalskega izvora. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta: 163 str.
- Hauge H. H., Mantzilas D., Moll G. N., Konings W. N., Driessen A. J. M., Eijsink V. G. H., Nissen-Meyer J. 1998. Plantaricin A is an ampiphilic α -helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms. *Biochemistry*, 37: 16026-16032.
- Hemert S., Meijerink M., Molenaar D., Bron P. A., de Vos P., Kleerebezem M., Wells J. M., Marco M. L. 2010. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes modulating the cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Microbiology*, 10: e293, doi: 10.1186/1471-2180-10-293, 10 str.
- Hurtado A., Reguant C., Bordons A., Rozes N. 2011. Expression of *Lactobacillus pentosus* B96 bacteriocin genes under saline stress. *Food Microbiology*, 28: 1339-1344.
- Karczewski J., Troost F. J., Konings I., Dekker J., Kleerebezem M., Brummer R.-J. M., Wells J. M. 2010. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* *in vivo* and protective effects on the epithelial barrier. *American Journal of Gastrointestinal Liver Physiology*, 298: G851-G859.
- Kawai Y., Saitoh B., Takahashi O., Kitazawa H., Saito T., Nakajima H., Itoh T. 2000. Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 64: 2201– 2208.

- Kawai Y., Takahashi R., Arakawa K., Saito T. 2006. Structural and functional characteristics of gassericin A and T produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 and LA158. *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria*, 17: 32-39.
- Kawai Y., Saito T. 2011. *Lactobacilli bacteriocins V: Lactic acid bacteria and bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research*. Sonomoto K., Yokota A. Norfolk, Caister Academic Press: 286 str.
- Khan H., Flint S.H., Yu P-L. 2013. Development of a chemically defined medium for the production of enterolysin A from *Enterococcus faecalis* B9510. *Journal of Applied Microbiology*, 114: 1092-1102.
- Klaenhammer T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337-349.
- Klingberg T.D., Pedersen M.H., Cencic A., Budde B.B. 2005. Application of measurements of transepithelial electrical resistance of intestinal epithelial cell monolayers to evaluate probiotic activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 11: 7528-7530.
- Lakshminarayanan B., Guinane C.M., O'Connor P.M., Coakley M., Hill C., Stanton C., O'Toole P.W., Ross R.P. 2013. Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the intestinal microbiota of elderly Irish subjects. *Journal of Applied Microbiology*, 114: 886-898.
- Leeber S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J. 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72: 728-764.
- Ma T.Y., Iwamoto G.K., Hoa N.T., Akotia V., Pedram A., Boivin M.A., Said H.M. 2004. TNF- α induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286: G367-G376.
- Maher S., McClean S. 2006. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells *in vitro*. *Biochemical Pharmacology*, 71: 1289-1298.

- Majeed H., Gillor O., Kerr B., Riley M.A. 2011. Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *ISME Journal*, 5: 71–81.
- Majhenič A.Č., Matijašič B.B., Rogelj I. 2003. Chromosomal location of the genetic determinants for bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *Journal of Dairy Research*, 70: 199-203.
- Majhenič A.Č., Venema K., Allison G.E., Matijašič B.B., Rogelj I., Klaenhammer T.R. 2004. DNA analysis of the genes encoding acidocin LF221 A and acidocin LF221 B, two bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* LF221. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: 705-714.
- Martinez C., Gonzales-Castro A., Vicario M., Santos J. 2012. Cellular and molecular basis of intestinal barrier dysfunction in the irritable bowel syndrome. *Gut and Liver*, 6: 305-315.
- Marzorati M., Van den Abbeele P., Possemiers S., Benner J., Verstraete W., Van de Wiele T. 2011. Studying the host-microbiota interaction in the human gastrointestinal tract: basic concepts and *in vitro* approaches. *Annals of Microbiology*, 61: 709-715.
- Matijašič B.B., Rogelj I., Nes I.F., Holo H. 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49: 606-612.
- Matijašič B.B., Rogelj I. 1999. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli isolated from cheese and baby faeces. *Food Technology and Biotechnology*, 37: 93–100.
- Matijašič B.B., Rogelj I. 2000. *Lactobacillus* K7 – A new candidate for a probiotic strain. *Food Technology and Biotechnology*, 38: 113-119.
- Matijašič B.B., Rogelj I., Batič M., Raspor P. 2001. Influence of pH on bacteriocin production by *Lactobacillus* K7 during batch fermentation. *Periodicum Biologorum*, 103: 163-167.

- Matijašić B.B., Narat M., Zorič M. 2003. Adhesion of two *Lactobacillus gasseri* probiotic strains on Caco-2 cells. *Food Technology and Biotechnology*, 41: 83–88.
- Matijašić B.B., Stojković S., Salobir J., Malovrh S., Rogelj I. 2004. Evaluation of the *Lactobacillus gasseri* K7 and LF221 strains in weaned piglets for their possible probiotic use and their detection in the faeces. *Animal Research*, 53: 35–44.
- Matijašić B.B., Narat M., Peternel M.Z., Rogelj I. 2006. Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *Escherichia coli* adhesion *in vitro* on Caco-2 cells and *ex vivo* on pigs' jejunal tissue. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 92–96.
- Meijerink M., van Hemert S., Taverne N., Wels M., de Vos P., Bron P. A., Savelkoul H. F., van Bilsen J., Kleerebezem M., Wells J. M. 2010. Identification of genetic loci in *Lactobacillus plantarum* that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization. *Plos One*, 5, 5: e10632, doi: 10.1371/journal.pone.0010632: 5 str.
- Messaoudi S., Manai M., Kergourlay G., Prvost H., Connil N., Chobert J-M., Dousset X. 2013. *Lactobacillus salivarius*: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology*, 36: 296-304.
- Mills S., Stanton C., Fitzgerald G.F., Ross R.P. 2011. Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again. *Microbial Cell Factories*, 10: e19, doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S19: 15 str.
- Monnet C., Ulve V., Sarthou A.S., Irlinger F. 2008. Extraction of RNA from cheese without prior separation of microbial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 5724-5730.
- Miyauchi E., O'Callaghan J., Butto L.F., Hurley G., Melgar S., Tanabe S., Shanahan F., Nally K., O'Tolle P.W. 2012. Mechanism of protection of transepithelial barrier function by *Lactobacillus salivarius*: strain dependence and attenuation by bacteriocin production. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303: G1029-G1041.

- Neish A. S. 2002. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microbes and Infection*, 4: 309-317.
- Nissen-Meyer J., Oppegard C., Rogne P., Haugen H. S., Kristiansen P. E. 2010. Structure and mode-of-action of the two-peptide (class-IIb) bacteriocins. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, 2: 52-60.
- Nissen-Meyer J., Holo H., Havarstein L.S., Sletten K., Nes I.F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of Bacteriology*, 174: 5686-5692.
- O'Callaghan J., Butto L.F., MacSharry J., Nally K., O'Toole P.W. 2012. Influence of adhesion and bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* on the intestinal epithelial cell transcriptional response. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 15: 5196-5203.
- O'Flaherty S., Klaenhammer T.R. 2010. The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut/host. *International Dairy Journal*, 20: 262-268.
- Ohland C. L., MacNaughton W. K. 2010. Probiotic bacteria and intestinal barrier function. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298: G807-G819.
- O'Shea E.F., Cotter P.D., Stanton C., Ross R.P., Hill C. 2012. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 152: 189-205.
- Parada J. L., Caron C. R., Medeiros A. B. P., Soccol C. R. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50: 521-542.
- Penders J., Stobberingh, van den Brandt P.A., Thijs C. 2007. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy*, 62: 1223-1236.

- Peternel M.Z., Majhenič Č.A., Holo H., Nes I.F., Salehian Z., Berlec A., Rogelj I. 2010. Wide-inhibitory spectra bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *Probiotics&Antimicrobial Proteins*, 2: 233-240.
- Philipp B. 2011. Bacterial degradation of bile salts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 903-915.
- Pinto M., Robine-Leon S., Appay M. D. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of Cell*, 47: 323-30.
- Remus D. M., Kleerebezem M., Bron P. A. 2011. An intimate tete-a-tete – How probiotic lactobacilli communicate with the host. *European Journal of Pharmacology*, 668: S33-S42.
- Ridlon J. M., Kang D.-J., Hylemon P.B. 2005. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*, 47: 241-259.
- Risoen P. A., Brurberg M. B., Eijsink V. G. H., Nes I. F. 2000. Functional analysis of promoters involved in quorum sensing-based regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus*. *Molecular Microbiology*, 37: 619-628.
- Ritter P., Kohler C., von Ah U. 2009. Evaluation of the passage of *Lactobacillus gasseri* K7 and bifidobacteria from the stomach to intestine using single reactor model. *BMC Microbiology*, 9: e87, doi:10.1186/1471-2180-9-87, 9 str.
- Rogelj I., Matijašić B.B. 2006. *Lactobacillus gasseri* LF221 and K7 – from isolation to application. *Biologia*, 61, 6: 761-769.
- Sagaya F.M., Hacin B., Tompa G., Ihan A., Škrajnar Š., Černe M., Hurrell R.F., Matijašić B.B., Rogelj I., Vergères G. 2014. *Lactobacillus gasseri* K7 modulates the blood cell transcriptome of conventional mice infected with *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*, 116, 5: 1282–1296.

- Sharma R., Young C., Neu J. 2010. Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010: ID 305879, doi:10.1155/2010/305879: 15 str.
- Selle K., Klaenhammer T.R. 2013. Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health. *FEMS Microbiology Review*, 37: 915–935.
- Stojković S. 2003. Preživetje in učinkovitost sevov *Lactobacillus gasseri* K7 in LF221 v različnih okoljskih razmerah. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 133 str.
- Suzuki T. 2013. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junction. *Cellular and Molecular Life Science*, 70: 631-659.
- Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriology Review*, 40: 722–756.
- Tahara T., Voshioka S., Utsumi R., Kanatani K. 1997. Isolation and partial characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* JCM 2124. *FEMS Microbiology Letters*, 148: 97-100.
- Todorov S.D., Vaz-Velho M., Gibbs P. 2004. Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 157-160.
- Todorov S.D., Dicks L.M.T. 2006. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry*, 41: 11-19.
- Treven P., Turkova K., Trmčić A., Obermajer T., Rogelj I., Matijašić B.B. 2013. Detection and quantification of probiotic strain *Lactobacillus gasseri* K7 in faecal samples by targeting bacteriocin genes. *Folia Microbiologica*, 58: 623–630.

- Treven P., Trmčič A., Bogovič Matijašić B., Rogelj I. 2014. Improved draft genome sequence of probiotic strain *Lactobacillus gasseri* K7. *Genome Announcements*, 2, 4: 1-2.
- Trinetta V., Rollini M., Manzoni M. 2008. Development of a low cost culture medium for sakacin A production by *L. sakei*. *Process Biochemistry*, 43: 1275-1280.
- Trmčič A., Monnet C., Rogelj I., Matijašić B.B. 2011. Expression of nisin genes in cheese – A quantitative real-time polymerase chain reaction approach. *Journal of Dairy Science*, 94: 77-85.
- Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer*, 26: 171-176.
- Turner J.R. 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews*, 9: 799-809.
- Ulluwishewa D., Anderson R. C., McNabb W. C., Moughan P. J., Wells J. M., Roy N. C. 2011. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *Journal of Nutrition*, 141: 769-776.
- Vermeulen M.A.R., De Jong J., Vaessen M.J., Van Leeuwen P. A.M., Houdijk A.P.J. 2011. Glutamate reduces experimental intestinal hyperpermeability and facilitates glutamine support of gut integrity. *World Journal of Gastroenterology*, 17, 12: 1569-1573.
- Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. Ljubljana, DZS: 259 str..
- Wells J.M. 2011. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microbial Cell Factories*, 10, 1: e17, doi:10.1186/1475-2859-10-S1-S17: 17 str.
- Whitehead K., Versalovic J., Roos S., Britton R. A. 2008. Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 1812–1819.

- Zacharof M.P., Coss G.M., Mandale S.J., Lovitt R.W. 2013. Separation of lactobacilli bacteriocins from fermented broths using membranes. *Process Biochemistry*, 48: 1252-1261.
- Zhang L., Li N, Caicedo R., Neu J. 2005. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition*, 135: 1752-1756.
- Zhu W.M., Liu W., Wu D.Q. 2000. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 877-886.
- Yu Q., Wang Z., Yang Q. 2012. *Lactobacillus amylophilus* D14 protects tight junction from enteropathogenic bacteria damage in Caco-2 cells. *Journal of Dairy Science*, 95: 5580-5587.

ZAHVALA

Za pomoč pri nastanku tega dela se zahvaljujem naslednjim osebam:

- mentorici viš. znan. sod. dr. Bojani Bogovič Matijašić za napotke pri delu, pregled in popravke disertacije in somentorici prof. dr. Mojci Narat, ki mi je omogočila delo s celičnimi linijami ter za popravke disertacije
- komisiji: prof. dr. Ireni Rogelj, prof. dr. Maji Rupnik in prof. dr. Alojzu Ihanu za popravke in nasvete
- dr. Gorazdu Tompa velika zahvala za vložen trud in čas pri čiščenju bakteriocinov, za popotnico za delo s HPLC sistemi, pomoč in nasvete pri pisanju članka ter razumevanje, vzpodbude in usmerjanje v trenutkih, ko sem se izgubila v raziskovalnem delu
- dr. Aljoši Trmčič za pomoč pri izolaciji RNA in RT-qPCR
- vsem ostalim sodelavcem Katedre za mlekarstvo in probiotike
- celotni ekipi prof. dr. Mojce Narat za pomoč in potrpežljivost, da sem lahko delala v celičnih laboratorijih
- dr. Mojci Benčina s Kemijskega inštituta v Ljubljani za uvajanje in pomoč pri uporabi konfokalnega mikroskopa
- srčna zahvala mojima staršema, ki sta mi omogočila izobraževanje ter nikoli nehala verjeti vame, tudi v trenutkih ko sem sama prenehala
- Anja, Anka, Katarina, Katja, Larisa, Manca, Tanja in Tina kljub večnemu pomanjkanju časa za druženje ste zelo pomembne osebe v mojem življenju; brez »žvečenja« življenjskih problemov, smeha in sprostitve bi bilo delo veliko težje.