

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Marija S. Miljković

Karakterizacija AggLb agregacionog faktora  
soja *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*  
BGNJ1-64

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

University of Belgrade

Faculty of Biology

Marija S. Miljković

Characterization of AggLb aggregation factor  
from strain *Lactobacillus paracasei* subsp.  
*paracasei* BGNJ1-64

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

**Mentor:**

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

dr **Branko Jovčić**, Vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd

**Članovi komisije:**

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

dr **Branko Jovčić**, Vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd

dr **Jelena Lozo**, Vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd

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

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.*

*Najveću zahvalnost dugujem dr Milanu Kojiću na svemu što sam naučila, na dragocanim savetima i nesebičnoj pomoći tokom eksperimentalne izrade teze, na vremenu i trudu koje je uložio u tumačenju dobijenih rezultata, na višečasovnim diskusijama o načinima prevazilaženja svih teškoća u radu, na sugestijama tokom pisanja, kao i na kritičkoj oceni teze. Iznad svega, neizmerno sam zahvalna na ukazanom poverenju, podršci i razumevanju.*

*Prof. dr Branku Jovčiću zahvaljujem se na smernicama i sugestijama tokom eksperimentalne izrade i pisanja teze, koje su doprinele njenoj efikasnijoj izradi. Takođe, zahvaljujem se i na kritičkoj oceni teze.*

*Prof. dr Jeleni Lozo zahvaljujem na savetima i korisnim idejama tokom pisanja, kao i na kritičkoj oceni teze.*

*Dr Miloradu Kojiću na izuzetno korisnim sugestijama tokom pisanja, kao i na kritičkoj oceni teze.*

*Veliku zahvalnost dugujem kolegama iz lab 06: Amareli, Đorđu, Jeleni, Ivani, Nataši, Maji, Kaći, Sanji, Brankici, Jovanki, Goci, Goranu, Nemanji, Dušanki, Nikoli, Svetlani i Milki. Posebno se zahvaljujem Kaćici i Miroslavu koji su sa mnom proživljavali sve uspone i padove proteklih godina. Hvala vam.*

*Dr Milici Živković koja me je uvela u istraživački rad dugujem izuzetnu zahvalnost na svemu što me je naučila i na strpljenju koje je uvek imala za mene.*

*Dr Snežani Kojić zahvaljujem se na stručnoj pomoći za dobijanje dela rezultata predstavljenih u tezi, kao i na neizmernoj podršci i razumevanju u svakom momentu.*

*Hvala Bogdanu, Ani, Ivani i Mini na prijateljstvu i na svim divnim, opuštenim trenucima...*

*Najdublju zahvalnost dugujem mojim roditeljima, Mileni i Stefanu na bezuslovnoj ljubavi i strpljenju...*

*mojim roditeljima...*

**Karakterizacija AggLb agregacionog faktora soja *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64**

**REZIME**

Odgovor bakterija na uticaj različitih faktora sredine koja ih okružuje, kao i njihova međusobna komunikacija, zavisi od procesa koji se odvijaju na površini bakterijskih ćelija. S obzirom na brojne mogućnosti primene bakterija roda *Lactobacillus*, kako u prehrambenoj industriji, tako i u medicini (u prevenciji i/ili lečenju bolesti), potrebno je što bolje okarakterisati komponente koje čine površinski sloj ovih bakterija. Agregacija bakterija, determinisana faktorima lociranim na površini ćelija može se smatrati poželjnom osobinom pri izboru probiotika, s obzirom da ima važnu ulogu u međubakterijskoj interakciji, u interakciji sa epitelijalnim ćelijama gastrointestinalnog trakta i doprinosi sposobnosti bakterija da se adsorbuju na različite površine, odnosno sposobnost agregacije omogućava uspešnu kolonizaciju staništa.

Kolekcija laktobacila Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju je pretražena na prisustvo sojeva koji poseduju sposobnost agregacije (Agg<sup>+</sup>), nakon čega je za dalji rad odabrano jedanaest sojeva: BGSJ2-8, BGGR2-68, BGGR2-82, BGDP1-84, BGDP9-38, BGNJ1-3, BGNJ1-61, BGNJ1-64, BGNJ1-70, BGZLS30-6 i BGAR75. Odabrani Agg<sup>+</sup> sojevi se na osnovu stepena agregacije i tipa formiranih agregata mogu podeliti u tri grupe: oni koji brzo, srednje i sporo agregiraju ili koji formiraju krupne, srednje i sitne agregate, pri čemu postoji direktna korelacija između brzine agregacije i tipa agregata. Analizom sposobnosti vezivanja odabranih Agg<sup>+</sup> sojeva laktobacila za komponente ekstracelularnog matriksa (ECM) zapažen je širok dijapazon sposobnosti vezivanja za kolagen - od intenzivnog afiniteta vezivanja do odsustva sposobnosti vezivanja za matriks. Pritom su pojedini sojevi, BGGR2-68 i BGGR2-82, ispoljili sposobnost vezivanja za plastiku (formiranje biofilma).

Analizom plazmidnog sastava Agg<sup>+</sup> sojeva konstatovano je prisustvo velikih plazmida u svim sojevima, a čišćenjem plazmida iz sojeva BGNJ1-64 i BGSJ2-8 potvrđena je plazmidna lokacija gena odgovornih za ekspresiju agregacionog fenotipa. Nakon konstrukcije i analize plazmidnih biblioteka sojeva BGNJ1-64 i BGSJ2-8, izolovan je konstrukt pALb35 (koji nosi *SacI* fragment veličine 11,4 kb poreklom iz plazmida pNJ1 soja BGNJ1-64) koji dovodi do ponovne pojave autoagregacionog fenotipa transformisanog heterologog domaćina BGKP1-20 (Agg<sup>-</sup>). Sposobnost autoagregacije derivata BGKP1-20/pALb35 je posledica

ekspresije *aggLb* gena koji se nalazi u okviru *SacI* fragmenta, konstrukta pALb35 korišćenog za transformaciju soja BGKP1-20. AggLb protein je najveći agregacioni faktor laktobacila do sada opisan u literaturi, veličine 318,6 kDa. Pored domena neophodnih za transport kroz membranu i ukotvljavanje, AggLb protein sadrži veći broj ponovaka dva različita tipa domena koji su veoma značajni za sposobnost adhezije: kolagen vezujući domeni na N-terminusu proteina (6 domena koji međusobno pokazuju veliku heterogenost; sa stepenom homologije manjim od 26%) i CnaB-like domeni (kolagen vezujući domeni B) na C-terminusu proteina (20 puta ponovljeni, skoro 100% identični, aminokiselinski ponovci).

U cilju razumevanja uloge, funkcije i stepena uticaja agregacionog faktora na probiotički potencijal soja BGNJ1-64 urađeni su eksperimenti funkcionalne karakterizacije AggLb proteina. Pokazano je da AggLb protein eksprimiran na površini heterologog domaćina BGKP1-20, ima ulogu u autoagregaciji i interakciji sa komponentama ECM-a, kao i u posledičnoj inhibiciji vezivanja patogenih sojeva za kolagen, dok njegov doprinos u koagregaciji patogenih sojeva *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 i *Listeria innocua* ATCC33090 nije detektovan. U *in vitro* eksperimentu je pokazano da prisustvo AggLb proteina na površini ćelija doprinosi u velikom stepenu ekskluziji patogena: *S. aureus* (62,87%) i *E. coli* O157:H7 (57,01%).

Konstrukcijom varijanti AggLb proteina koji u različitim kombinacijama sadrže različit broj kolagen vezujućih domena (6, 2 (hibridi I-V i VI domen), 1+1/2 (1/2 V i VI domen) ili 0 (bez domena)) i CnaB-like domena (20, 10, 7, 5 ili 2), omogućeno je sagledavanje doprinosa pojedinačnih domena u okviru AggLb proteina u ostvarivanju njegovih pozitivnih probiotičkih efekata. Konstrukcijom hibridnog proteina koji sadrži prvi deo kao kod laktokokalnog agregacionog faktora i drugi deo kao laktobacilusni faktor agregacije, omogućeno je praćenje doprinosa različitih tipova kolagen vezujućih motiva u interakciji sa receptornim molekulima. Pokazano je da od analiziranih derivata jedino varijanta AggLb proteina, eksprimirana na površini bakterijske ćelije koja sadrži kolagen vezujuće domene II, III i IV, je bila sposobna da indukuje autoagregaciju, vezivanje za kolagen i fibronektin ukazujući da su ova tri domena najodgovornija za navedene funkcije. CnaB-like domeni najverovatnije nemaju direktnu ulogu u agregaciji i vezivanju za kolagen i fibronektin, već se njihov doprinos ogleda u pozicioniranju kolagen vezujućih domena što dalje od površine ćelije kako bi se što efikasnije omogućila interakcija ovih domena sa receptornim molekulima koji mogu biti na različitoj udaljenosti od bakterijskih ćelija unutar

ECM-a. Takođe, pokazano je da je tip kolagen vezujućih domena prisutnih u agregacionom proteinu važniji od broja njihovih ponovaka. Primećeno je da uklanjanje određenih domena u AggLb proteinu ne samo da onemogućava njegove funkcije autoagregacije i vezivanja za komponente ECM-a kod pojedinih derivata koji na površini eksprimiraju određene varijante AggLb proteina, već istovremeno rezultira mogućnošću pojedinih domena AggLb proteina da dođu do izražaja (bivaju demaskirani otklanjanjem drugih domena) i preuzmu funkciju formiranja biofilma. Delecija pojedinih domena prevodi AggLb protein iz jednog kompleksa funkcija koje su direktno povezane sa prisustvom određenih domena u drugu funkciju koja nije možda tako intenzivna kao prethodne ali je zasigurno značajna ukazujući da proteini mogu imati širi potencijal funkcija nego što mi na prvi pogled vidimo.

**Ključne reči:** Laktobacili, agregacija, agregacioni faktor AggLb, kolagen vezujući domeni, kolagen vezujući domeni B (CnaB-like), varijante AggLb proteina, adhezija, ekskluzija patogena, biofilm.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna genetika i genetičko inženjerstvo

**UDK:** 579.864:577.11(043.3)



**Characterization of AggLb aggregation factor from strain *Lactobacillus paracasei*  
subsp. *paracasei* BGNJ1-64**

**ABSTRACT**

Response of bacteria to different environmental factors as well as their communication primarily depends on the processes that occur on their cell surface. Due to the continuously increasing number of application possibilities of lactobacilli, both in the food industry and in medicine (in the prevention and/or treatment of the disease), there is a need for a more comprehensive characterization of the components that form the surface layer of these bacteria. Aggregation ability of bacteria, determined by factors located on the cell surface could be considered as a desirable trait in the selection of probiotics. Since it plays an important role in the interaction between bacteria, in interaction with the epithelial cells of the gastrointestinal tract plus contributing to the bacterial capability to adhere to different surfaces, which is an important feature enabling them to successfully colonize diverse habitats.

Lactobacilli collection of Laboratory for molecular microbiology was screened for the presence of strains possessing the aggregation ability (Agg<sup>+</sup>) and for the further work eleven strains have been selected: BGSJ2-8, BGGR2-68, BGGR2-82, BGDP1-84, BGDP9-38, BGNJ1-3, BGNJ1-61, BGNJ1-64, BGNJ1-70, BGZLS30-6 and BGAR75 which, according to the level of aggregation and the appearance of the aggregates formed, could be classified into three groups: the fast, the medium and the slow aggregating ones or into the groups of those forming large, medium or small aggregates wherein a direct correlation between the aggregation kinetics and the type of the formed aggregates was found. By analyzing the binding ability of the selected Agg<sup>+</sup> strains of lactobacilli to the components of extracellular matrix (ECM) a wide range of binding capacity to collagen was observed, varying from the intensive to the complete lack of the binding capacity to the matrix. Two strains (BGGR2-68 and BGGR2-82) showed the ability to bind even to plastics (form biofilms).

By analyzing the plasmid composition of Agg<sup>+</sup> strains, the presence of large plasmids was detected in all strains. The plasmid curing experiments confirmed the plasmid location of the gene(s) responsible for the expression of aggregation phenotype in strains BGNJ1-64 and BGSJ2-8. After the construction and analysis of BGNJ1-64 and BGSJ2-8 strains plasmid libraries, selected construct pALb35 (which carries the *SacI* fragment of 11.4 kb. derived from plasmid pNJ1 from strain BGNJ1-64) was able to reconstitute the autoaggregation

ability of the transformed heterologous host BGKP1-20 (Agg<sup>-</sup>). The autoaggregation ability of the derivative BGKP1-20/pALb35 was the result of expression of *aggLb* gene located within the *SacI* fragment in the construct pALb35 used for transformation of BGKP1-20 strain. AggLb protein is the largest aggregation factor in lactobacilli so far described in the literature, with the molecular mass of 318.6 kDa. In addition to all sequences necessary for the export and anchoring, AggLb protein contains a number of repeats of two different types of domains, which are important for the adhesion, namely the collagen-binding domains at the N-terminus of the protein (6 domains, with great heterogeneity, with less than 26% of homology) and the CnaB-like domains (collagen binding domain B) at the C-terminus of the protein (repeated 20 times, with an almost 100% identical amino acid repeats).

In order to understand the aggregation factor role, function and level of contribution to the probiotic potential of strain BGNJ1-64, experiments of functional analysis were done. It was shown that AggLb protein expressed on the surface of the heterologous host BGKP1-20, plays a role in autoaggregation and interaction with the components of the ECM, consequently inhibiting binding of pathogenic strains to the collagen, while its impact on the coaggregation with pathogenic strains *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria innocua* ATCC33090 was not detected. *In vitro* experiments demonstrated that the presence of the AggLb protein on the cell surface contributes greatly to exclusion of pathogens: *S. aureus* (62,87%) and *E. coli* O157:H7 (57,01%).

Constructed variants of AggLb protein designed to have different combinations with different numbers of repeats of the collagen binding domains (6, 2 (hybrids domains IV and VI), 1 + 1/2 (2.1 V and VI domains) or 0 (no domains)) and CnaB- like domains (20, 10, 7, 5 and 2) enabled the assessment of the contribution of the individual domains within the AggLb protein in achieving its probiotic effect. By construction of a hybrid protein containing the proximal part of the lactococcal aggregation factor (AggL) and the distal part consisted of lactobacilli aggregation factor (AggLb) it was possible to monitor the contribution of the different types of collagen binding motifs in the interaction with the receptor molecules. It is shown that among the analyzed derivatives only a variant of the AggLb protein expressed on the surface of bacterial cells containing the collagen binding domains II, III and IV was able to induce autoaggregation, binding to collagen and fibronectin, indicating that these three domains are those the most responsible for the functions. CnaB-like domains likely has no direct role in the aggregation and binding to collagen and fibronectin, but their contribution is reflected in pulling forward collagen binding domains away from the cell surface in order to

allow more efficient interaction of the domains with the receptor molecules so that they could be positioned at different distances from the bacterial cells within EMC. Also, it was shown that the type of collagen binding domains present in the aggregation protein is more important than the number of their copies. It was noted that the removal of certain domains in the AggLb protein not only prevents its autoaggregation and binding to components of ECM in certain derivatives expressing specific variants of AggLb protein on the surface, but also results in the ability of some protein domains of the AggLb to come to the fore (are unmasked by elimination of other domains) and assume the function of biofilm formation. Deletion of certain domains switches the AggLb protein from one set of functions (that are directly related to the presence certain domains) to an another function that is not as intense as the previous one but is certainly significant, indicating that the proteins can have a wider range of functions than we see at the first glance.

**Keywords:** Lactobacilli, aggregation, aggregation factor AggLb, collagen binding domain, collagen binding domain B (CnaB-like), variants of AggLb protein, adhesion, exclusion of pathogens, biofilm.

**Academic Expertise:** Biology

**Field of Academic Expertise:** Molecular genetics and genetic engineering

**UDC:** 579.864:577.11(043.3)

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
1.1. Bakterije mlečne kiseline - opšte karakteristike.....	2
1.1.1. Bakterije roda <i>Lactobacillus</i> - opšte karakteristike .....	3
1.2. Probiotici .....	6
1.2.1. Osnovni kriterijumi za odabir probiotika.....	7
1.2.2. Mehanizmi ostvarivanja probiotičkog efekta.....	9
1.2.3. Bakterije roda <i>Lactobacillus</i> kao probiotici.....	13
1.3. Površinske karakteristike bakterija roda <i>Lactobacillus</i> .....	14
1.3.1. Površinske karakteristike bakterija roda <i>Lactobacillus</i> - kratak pregled .....	14
1.3.2. Faktori koji doprinose adheziji bakterija roda <i>Lactobacillus</i> u GI traktu .....	16
1.3.2.1. Sposobnost formiranja biofilma bakterija roda <i>Lactobacillus</i> .....	20
1.3.3. Agregacioni faktori bakterija roda <i>Lactobacillus</i> .....	20
1.4. Uloga bakterija roda <i>Lactobacillus</i> u prevenciji i poboljšanju simptoma različitih zdravstvenih problema .....	23
1.5. Prirodni izolati bakterija roda <i>Lactobacillus</i> .....	25
2. CILJ RADA.....	27
3. MATERIJAL I METODE.....	30
3.1. Bakterijski sojevi i derivati .....	30
3.2. Korišćeni plazmidi .....	32
3.3. Medijumi za optimalan rast i kultivacija bakterija.....	35
3.4. Metode rada sa bakterijama.....	36
3.4.1. Metode izolovanja i determinacije sojeva.....	36
3.4.2. Čišćenje plazmida iz ćelija laktobacila .....	36
3.4.3. Transformacija <i>E. coli</i> ćelija .....	37
3.4.3.1. Priprema <i>E. coli</i> kompetentnih ćelija .....	37
3.4.3.2. Transformacija <i>E. coli</i> kompetentnih ćelija toplotnim šokom („Heat shock“) .....	37
3.4.4. Transformacija BMK .....	38
3.4.4.1. Transformacija laktobacila elektroporacijom .....	38
3.4.4.2. Transformacija laktokoka i enterokoka elektroporacijom.....	38
3.4.5. Metode analize agregacije i površinskih karakteristika odabranih laktobacila ..	39
3.4.5.1. Kinetika autoagregacije i koagregacije.....	39

3.4.5.2.	Određivanje prirode faktora koji učestvuju u agregaciji .....	40
3.4.5.3.	Analiza površinskih karakteristika laktobacila - adhezija za organske rastvarače .....	40
3.4.5.4.	Analiza vezivanja za imobilisani kolagen .....	41
3.4.5.5.	Analiza vezivanja za imobilisani fibronektin .....	42
3.4.5.6.	Analiza sposobnosti formiranja biofilma .....	42
3.4.5.7.	Analiza sposobnosti odabranih sojeva laktobacila u ekskluziji patogena ..	43
3.5.	Metode rada sa DNK.....	43
3.5.1.	Metode izolacije DNK iz bakterija .....	43
3.5.1.1.	Metoda za brzo izolovanje ukupne DNK iz laktobacila.....	43
3.5.1.2.	Metoda za izolovanje velikih količina plazmidne DNK iz laktobacila .....	44
3.5.1.2.1.	Prečišćavanje plazmidne DNK u gradijentu CsCl.....	45
3.5.1.3.	Mini metod za izolovanje velikih plazmida iz laktobacila.....	45
3.5.1.4.	Mini metod za izolovanje plazmidne DNK iz <i>E. coli</i> .....	46
3.5.1.5.	Mini metod za izolovanje plazmidne DNK iz <i>E. coli</i> za potrebe sekvenciranja i kloniranja .....	46
3.5.2.	Enzimske reakcije sa DNK .....	47
3.5.2.1.	Sečenje DNK restrikcionim enzimima .....	47
3.5.2.2.	Defosforilacija 5' slobodnih krajeva DNK fragmenata .....	47
3.5.2.3.	Ligacija DNK fragmenata .....	47
3.5.2.4.	Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom („Polymerase Chain Reaction“) .....	47
3.5.3.	Konstrukcija delecija u DNK korišćenjem egzonukleaze III (Exo III) .....	48
3.5.4.	Sekvenciranje DNK .....	49
3.5.5.	Elektroforeza i elucija DNK .....	49
3.5.5.1.	Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu .....	49
3.5.5.2.	Gel elektroforeza u pulsirajućem električnom polju (PFGE).....	50
3.5.5.3.	Elucija DNK fragmenata .....	51
3.5.6.	Konstrukcija plazmidnih biblioteka sojeva BGNJ1-64 i BGSJ2-8 u cilju kloniranja gena koji kodira agregacioni faktor laktobacila .....	51
3.5.7.	Genetičke manipulacije u cilju konstrukcije varijanti AggLb proteina.....	51
3.5.8.	DNK-DNK hibridizacija (Southern blot).....	53
3.5.8.1.	Prenos DNK sa gela na najlonsku membranu .....	53
3.5.8.2.	Obeležavanje DNK probe digoksinom .....	54

3.5.8.3.	Neradioaktivna DNK-DNK hibridizacija.....	54
3.6.	Metode rada sa proteinima .....	55
3.6.1.	Pripremanje epitopa za indukciju produkcije poliklonskog AggLb antitela .....	55
3.6.2.	Izolacija i prečišćavanje AggBS-His <sub>6</sub> rekombinantnog protein u denaturišućim uslovima.....	55
3.6.3.	Određivanje koncentracije proteina u uzorku .....	56
3.6.4.	Elektroforeza proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE).....	56
3.6.5.	Dot-blot analiza.....	57
3.7.	Statistička obrada podataka .....	57
4.	REZULTATI .....	59
4.1.	Odabir sojeva roda <i>Lactobacillus</i> na osnovu agregacionog fenotipa.....	59
4.1.1.	Stepen autoagregacije odabranih sojeva roda <i>Lactobacillus</i> .....	60
4.1.2.	Sposobnost vezivanja odabranih sojeva za imobilisani kolagen .....	61
4.2.	Karakterizacija prirode agregacionog faktora koji utiče na sposobnost autoagregacije odabranih sojeva roda <i>Lactobacillus</i> .....	62
4.2.1.	Odabrani sojevi laktobacila ekspimiraju novi agregacioni faktor .....	63
4.3.	Lokalizacija gena koji kodiraju za faktore koji utiču na sposobnost autoagregacije odabranih sojeva roda <i>Lactobacillus</i> .....	64
4.4.	Kloniranje gena koji kodira agregacioni faktor laktobacila i njegova ekspresija u heterologim domaćinima.....	66
4.5.	Sekvenciranje i molekularna karakterizacija konstrukta pALb35 .....	67
4.6.	Domenska organizacija AggLb proteina.....	69
4.7.	Funkcionalna karakterizacija AggLb proteina .....	70
4.7.1.	Sposobnost vezivanja analiziranih sojeva za imobilisani kolagen .....	71
4.7.2.	Analiza uloge AggLb proteina u promeni površinskih osobina testiranih sojeva - adhezija za organske rastvarače .....	72
4.7.3.	Analiza uloge AggLb proteina u ekskluziji patogenih sojeva .....	73
4.7.4.	Analiza uloge AggLb proteina u koagregaciji patogenih sojeva.....	74
4.7.5.	Varijante AggLb proteina i njihova heterologa ekspresija .....	75
4.7.5.1.	Potvrda ekspresije svih varijanti AggLb proteina na površini bakterijskih ćelija .....	79
4.7.6.	Funkcionalna karakterizacija varijanti AggLb proteina .....	80
4.7.6.1.	Stepen autoagregacije varijanti AggLb ekspimiranih na površini bakterijskih ćelija.....	80

4.7.6.2. Stepen vezivanja za imobilisani kolagen varijanti AggLb eksprimiranih na površini bakterijskih ćelija.....	81
4.7.6.3. Stepen vezivanja za imobilisani fibronektin varijanti AggLb proteina eksprimiranih na površini bakterijskih ćelija.....	83
4.7.6.4. Sposobnost formiranja biofilma kod derivata koji eksprimiraju različite varijante AggLb proteina na površini bakterijskih ćelija.....	84
4.7.6.5. Međusobna zavisnost analiziranih svojstava varijanti AggLb proteina eksprimiranih na površini bakterijskih ćelija.....	85
4.8. Selekcija sojeva koji poseduju homologe <i>aggLb</i> gena za agregacioni faktor među odabranim Agg <sup>+</sup> sojevima roda <i>Lactobacillus</i> .....	88
5. DISKUSIJA.....	91
6. ZAKLJUČCI.....	107
7. LITERATURA.....	110
PRILOZI.....	132
Prilog 1.....	132
Prilog 2.....	133
Prilog 3.....	134
Prilog 4.....	137
Prilog 5.....	138
Prilog 6.....	139

# **1. UVOD**



## 1. UVOD

### 1.1. Bakterije mlečne kiseline - opšte karakteristike

Bakterije mlečne kiseline (BMK) predstavljaju filogenetski raznovrsnu grupu Gram-pozitivnih, nesporulišućih, anaerobnih ili fakultativno anaerobnih mikroorganizama, koji su dobili naziv na osnovu toga što, kao glavni produkt fermentativnog metabolizma, sintetišu mlečnu kiselinu. Ukoliko je mlečna kiselina jedini krajnji produkt fermentacije reč je o homofermentativnim BMK. Kod heterofermentativnih vrsta, krajnji produkti fermentacije, pored mlečne kiseline su i sirćetna kiselina, etanol i ugljen dioksid (Kleerebezem and Hugenholtz, 2003). Pored produkcije primarnih metabolita, BMK proizvode različite antimikrobne komponente kao što su: organske kiseline, diacetil i acetaldehid, vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), masne kiseline, piroglutaminska kiselina i niz drugih neorganskih jedinjenja, što u mnogome doprinosi njihovoj upotrebi u prehrambenoj industriji.

BMK zauzimaju ključno mesto u industriji fermentisane hrane gde se koriste kao starter kulture za proizvodnju mlečnih fermentisanih proizvoda (jogurta, kiselog mleka i sireva), mesnih preradevina, u proizvodnji fermentisanog povrća (kisel kupus, krastavac), pića (piva i vina), kao i u procesu fermentacije kiselih testa i silaže za stočnu ishranu (Stiles, 1996). Metabolička aktivnost BMK tokom procesa fermentacije utiče na trajnost proizvoda kroz snižavanje pH sredine kao posledice njihovog metabolizma što ima značajnu ulogu u konzervaciji hrane. Brz rast BMK u fermentisanim proizvodima, zasniva se na nekoliko jednostavnih principa: nakon uspostavljanja pogodnih sredinskih fizičko-hemijskih uslova, dolazi do rasta i kompeticije različitih mikroorganizama, prisutnih u navedenim nišama; brži razvoj BMK i snižavanje pH proizvoda dovodi do smanjenja ili potpunog zaustavljanja rasta nepoželjne mikroflore, usled brze produkcije kiseline, što ih izdvaja u dominantnu grupu i dovodi do formiranja stabilnog fermentisanog produkta (Mayra-Makinen and Bigret, 1998).

Najbolje proučeni rodovi BMK su: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, a pored navedenih u BMK spadaju i rodovi: *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella*.

### 1.1.1. Bakterije roda *Lactobacillus* - opšte karakteristike

Rod *Lactobacillus* pripada razdelu *Firmicutes*, klasi *Bacilli*, redu *Lactobacillales*, porodici *Lactobacillaceae* (Dellaglio and Felis, 2005). Opšte prihvaćena klasifikacija laktobacila još uvek nije dovršena, delom zbog neprestanog izolovanja i karakterizacije novih vrsta, a delom zbog odabira metode za identifikaciju vrsta. Identifikacija laktobacila na osnovu ćelijske morfologije, analize produkata fermentacije, enzimske aktivnosti, strukture ćelijskog zida i drugi fenotipski testovi danas se koriste samo kao polazna osnova pri preliminarnoj klasifikaciji rodova laktobacila. Za precizniju identifikaciju bakterija najčešće se koristi metoda sekvenciranja gena za 16S i/ili 23S rRNK, a determinacija soja vrši se poređenjem dobijene sekvence sa sekvencama dostupnim u relevantnim bazama podataka. Danas, pored različitih metoda identifikacije baziranih na PCR-u (Polymerase Chain Reaction), dostupne su i kompleksnije metode tipizacije sojeva, kao što je npr. PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) metoda koja je posebno pogodna za uočavanje polimorfizama i strukturnih promena (rearažmana) kao što su delecije, insercije ili inverzije unutar hromozomalne i plazmidne DNK određene vrste. Najsavremeniji način identifikacije bakterija jeste sekvenciranje celokupnog genoma. Poslednjih godina u porastu je broj sekvenciranih bakterijskih genoma laktobacila, što posledično dovodi do ekspanzije broja okarakterisanih vrsta unutar roda *Lactobacillus* i omogućava kompletnu taksonomsku i funkcionalnu analizu. Početkom 2006. godine bilo je okarakterisano 60 vrsta, 2009. godine u sistematici je navedeno 96 vrsta, (mada u isto vreme druga grupa istraživača navodi da je okarakterisano 125 vrsta), dok je prema najnovijim podacima u okviru roda *Lactobacillus* identifikovano više od 150 vrsta (Cancaya *et al.*, 2006; Hammes and Hertel, 2009; Ljung and Wadstrom, 2009; O'Donnell *et al.*, 2013).

Među BMK, rod *Lactobacillus* obuhvata najveći broj izolovanih vrsta. Diverzitet vrsta u okviru ovog roda je veoma veliki i uključuje vrste sa različitim fenotipskim, biohemijskim i fiziološkim osobinama.

Predstavnici roda *Lactobacillus* na osnovu fermentacionog metabolizma mogu se podeliti na tri grupe (Hammes and Vogel, 1995):

1. Obligatno homofermentativni laktobacili koji fermentišu heksoze do mlečne kiseline, dok pentoze i glukonat ne fermentišu (tipični predstavnici su: *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* i *Lb. helveticus*);

2. Fakultativno heterofermentativni laktobacili koji fermentišu heksoze do mlečne kiseline, mogu da produkuju gas iz glukonata, ali ne iz glukoze (tipični predstavnici su: *Lb. casei* i *Lb. plantarum*);

3. Obligatno heterofermentativni laktobacili koji fermentišu heksoze do mlečne i sirćetne kiseline, etanola i ugljendioksida (tipični predstavnici su: *Lb. brevis*, *Lb. reuteri*, *Lb. fermentum*, *Lb. buchneri* i *Lb. fructosus*).

Kao i većina BMK, laktobacili su auksotrofi za različit broj aminokiselina zbog čega njihovo preživljavanje i rast u mleku zavise od prisustva proteolitičkog sistema. Naime, laktobacili imaju veoma jednostavan metabolizam i visoke zahteve za nutritivnim komponentama u medijumu za rast. Laktobacili su nesporogene bakterije čije su ćelije oblika dužih ili kraćih štapića, povezanih u lance. Predstavnici ovog roda spadaju u katalaza-negativne, mikroaerofilne bakterije (samo donekle tolerišu prisustvo kiseonika), najbolji rast postižu na površini čvrstih hranljivih podloga, na optimalnoj pH vrednosti za rast laktobacila od 5,5 do 6,2 (mada mogu tolerisati i vrednosti pH niže od 5) i u uslovima redukovanog parcijalnog pritiska kiseonika, pri koncentraciji CO<sub>2</sub> od 5 do 10%. Optimalna temperatura za rast ovih bakterija kreće se od 30°C do 40°C. Neznatan broj vrsta raste na temperaturi ispod 15°C (pojedine vrste čak na temperaturama ispod 5°C), dok termofilni laktobacili rastu na 55°C što je i najviša temperatura utvrđena za rast predstavnika roda *Lactobacillus*.

Genomi laktobacila spadaju u grupu G+C siromašnih, tako da G+C sastav njihove DNK varira od 33-55 mol% (Coenye and Vandamme, 2003). S obzirom da predstavnici roda *Lactobacillus* naseljavaju staništa u kojima je smanjena koncentracija kiseonika i koja su bogata hranljivim materijama, veličina genoma je u korelaciji sa njihovim veoma jednostavnim metaboličkim kapacitetima, varira od 1,8 Mb kod *Lb. gasseri* ATCC33323 do 3,3 Mb kod soja *Lb. plantarum* WSFS1 (Drissi *et al.*, 2014). Većina sojeva, predstavnika roda *Lactobacillus* poseduje plazmide; u jednoj bakteriji može biti prisutno i do deset različitih plazmida, pri čemu veličina plazmida veoma varira (od nekoliko kb do preko 100 kb) (Roussel *et al.*, 1993). Na plazmidima su često locirani geni koji kodiraju za važne fenotipske karakteristike: proizvodnja i rezistencija na bakteriocine, metabolizam prostih ugljenih hidrata, metabolizam proteina, sinteza egzopolisaharida, sinteza agregacionih faktora i slično. Uglavnom, najčešće prisutni geni na plazmidima su oni koji obezbeđuju ekspresiju proteina koji omogućavaju opstanak bakterijske populacije u određenim uslovima na datom staništu, a njihov transfer iz jedne ćelije u drugu odvija se mehanizmom konjugacije

(Clewell, 1994). U vezi sa ovim fenomenom, kod pojedinih predstavnika roda *Lactobacillus*, razvijen je sistem agregacije koji olakšava komunikaciju između ćelija.

Prirodno životno stanište laktobacila usko je povezano sa fermentisanim mesnim, mlečnim i proizvodima od žitarica, takođe, rasprostranjeni su i kao deo epifitne mikrobiote. Mnogi laktobacili čine značajni deo mikrobiote koja naseljava mukozne površine gastrointestinalnog (GI) i urogenitalnog (UG) trakta, nosne šupljine, a mogu se naći i na celoj površini kože sisara, uključujući i čoveka (Prescott *et al.*, 1999). Kompletan GI trakt čoveka naseljava više od 400 vrsta bakterija, ali njihova brojnost varira u različitim segmentima digestivnog trakta. Tako se u usnoj duplji i pljuvački broj mikroorganizama kreće od  $10^5$  do  $10^8$  CFU/ml, u jednjaku  $10^4$  CFU/ml, u želucu od  $10^1$  do  $10^3$  CFU/ml, u duodeumu oko  $10^4$  CFU/ml, u prednjem delu tankog creva oko  $10^7$  CFU/g, u zadnjem delu tankog creva do  $10^9$  CFU/g, dok je u debelom crevu  $10^{12}$  CFU/g. Mikrobiotu zdrave vagine čine pretežno bakterije roda *Lactobacillus*, pri čemu su dominantno zastupljene vrste: *Lb. crispatus*, *Lb. jensenii*, *Lb. iners* i *Lb. gasseri* (Vasquez *et al.*, 2002). Sveobuhvatno, kod odraslih osoba bakterije roda *Lactobacillus* čine 0,01 do 0,6% od ukupnog broja fekalnih mikroorganizama (Botina *et al.*, 2010).

Danas se zna da je mikrobiota od velikog značaja za svog domaćina, jer za njega obavlja brojne funkcije, ali isto tako i da mnoge bolesti mogu nastati kao posledica poremećenog balansa, kako među mikroorganizmima, tako i između mikroorganizama i domaćina (Round and Mazmanian, 2009). Sposobnost bakterija roda *Lactobacillus* da uspešno restauriraju ekološki ekvilibrijum GI i UG trakta se sve više koristi u medicini, u stabilizaciji mikrobiološke zajednice creva ili kolonizaciji creva kod akutnih dijareja uzrokovanih patogenim bakterijama ili u slučajevima oštećenja mukoznog tkiva creva i kao alternativa u medicinskim dijetama (Mayra-Makinen and Bigret, 1998; Prescott *et al.*, 1999).

Laktobacili imaju „GRAS“ (Generally Recognized As Safe) status, nisu patogeni za životinje i čoveka, pa stoga postoji veliko interesovanje za unapređenje njihove primene kao probiotika u cilju poboljšanja opšteg stanja organizma sisara i čoveka. Dodatno, EFSA (European Food Safety Authority) je razvila QPS (Qualified Presumption of Safety) sistem, pomoću koga se vrši procena sigurnosti mikroorganizama koji se ciljno unose u lanac ishrane. Poslednjih 30-ak godina laktobacili su u žiži interesovanja zahvaljujući sve većoj praktičnoj primeni u industriji kao komercijalne starter kulture, kao prirodni konzervansi, bilo da se koriste kao prirodna mikrobiološka zajednica ili da se koriste njihovi antibakterijski

produkti. Smatra se da laktobacili, uz pomoć primarnih i sekundarnih metabolita koji nastaju usled fermentacije i/ili komponentama samih ćelija, utiču na povećanje nutritivnih vrednosti, doprinose karakterističnom ukusu, aromi i konzistenciji finalnog fermentisanog proizvoda. Na osnovu svega navedenog, jasno je da je višestruka uloga laktobacila u procesu formiranja finalnog proizvoda. Formiranje specifične teksture i donekle ukusa fermentisanog proizvoda rezultat je degradacije mlečnog proteina kazeina do malih peptida i aminokiselina. Aroma fermentisanih proizvoda velikim delom zavisi od sekundarnih metabolita koje produkuju laktobacili, dok je konzistencija proizvoda direktno povezana sa sposobnošću sinteze egzopolisaharida (Yang *et al.*, 2010).

## 1.2. Probiotici

Iako počeci upotrebe fermentisanih namirnica i mlečnih proizvoda prethode zabeleženoj istoriji, tek početkom XX veka počela su sve intenzivnija istraživanja pozitivnih bioloških efekata BMK, a među njima i vrsta roda *Lactobacillus*. Veliki broj kako pionirskih tako i najskorijih *in vitro* i/ili *in vivo* eksperimentalnih rezultata, ukazivao je na pozitivan efekat velikog broja predstavnika roda *Lactobacillus*, prilikom praćenja jednog ili više kriterijuma koji bi se koristili za selekciju probiotičkog soja (Aiba *et al.*, 1998; Lebeer *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2003; Parvez *et al.*, 2006; Vesterlund *et al.*, 2006; Yan and Polk, 2002). Ipak, potrebno je naglasiti da, u pojedinim slučajevima, postoje i izveštaji o infekcijama kod imunokompromitovanih pacijenata za koje se pretpostavlja da su izazvane probiotičkim laktobacilima (Liong, 2008). Zapažanja i sveobuhvatni rezultati pomenutih ispitivanja, omogućili su definisanje kriterijuma za selekciju i karakterizaciju probiotičkih kultura. Danas, je definicija probiotika nedvosmislena i jasna. Probioticima se smatraju svi mikroorganizmi koji nakon unošenja u organizam u određenom broju, ispoljavaju povoljne zdravstvene efekte, značajnije u odnosu na uobičajne pozitivne efekte ishrane (FAO-WHO, 2006; Guarner and Schaafsma, 1998).

Činjenica da probiotici imaju dugu istoriju primene, sve više doprinosi njihovom prihvatanju od strane potrošača, te tako zauzimaju značajno mesto u svakodnevnoj ishrani, prevenciji i terapiji simptoma pojedinih bolesti. Probiotici se mogu unositi u organizam kao funkcionalna hrana ili u vidu farmaceutskih preparata (kapsule ili/i liofilizovani prah i preparati za lokalnu upotrebu (vaginalni preparati)) zbog čega se mogu svrstati u bioterapeutike (Holzapfel, 2006). Vrlo je izražena specifičnost delovanja mikroorganizma, tako da različiti probiotici imaju različit spektar pozitivnog delovanja. Smatra se da je

dovoljno uzimati od  $10^6$  do  $10^{10}$  živih ćelija probiotika dnevno, preko odgovarajućih mlečnih proizvoda, da bi se ostvario blagotvoran efekat probiotika (Bernardeau *et al.*, 2006).

U sastavu finalnog probiotičkog preparata mogu se naći pojedinačni i smeše probiotičkih sojeva. Veoma često se probiotici koriste u kombinaciji sa prebioticima. Prebiotici su definisani kao nesvarljivi ili teško svarljivi sastojci hrane (laktuloza, inulin i različite vrste oligo i polisaharida) koji selektivno stimulišu rast i aktivnost probiotičkih bakterija u GI traktu.

### 1.2.1. Osnovni kriterijumi za odabir probiotika

Pre početka konkretnih eksperimenata ispitivanja probiotičkog potencijala datog soja, podrazumeva se da soj mora da bude nezavisno determinisan i okarakterisan. Jedino adekvatno i potpuno definisan soj, kao i njegovi produkti, može biti uključen u dalja ispitivanja.

Da bi neki soj bio okarakterisan kao probiotik potrebno je da zadovolji određene kriterijume. Osnovni zahtev, kada je reč o prebioticima, jeste da dati mikroorganizam ne pokazuje patogeno ponašanje i da produkuje antimikrobne supstance. Takođe, probiotici moraju da prežive i da se razmnožavaju u uslovima koji vladaju u GI traktu, pri čemu moraju da pokažu sposobnost tolerancije na niske pH vrednosti i rezistenciju na želudačni sok i žučne soli. Izolacija i karakterizacija soja koji ispunjava navedene uslove nije jednostavan zahtev. Tako je nedavno pokazano da iako sojevi *Lb. johnsonii* K4, *Lb. brevis* O22 i *Lb. plantarum* K1 preživljavaju podjednako dobro u uslovima simuliranog GI trakta, jedino se soj *Lb. johnsonii* K4 karakteriše sposobnošću adhezije u *in vitro* ekperimentima za analizu probiotičkih svojstva odabrane grupe laktobacila (Zielińska *et al.*, 2015).

U dostupnim genomima nekih laktobacila, uočena je široka distribucija gena koji kodiraju hidrolaze žučnih soli, što ih čini kandidatima za probiotike. Hidrolaze žučnih soli su od suštinskog značaja za toleranciju žučnih soli kod *Lb. plantarum* i *Lb. salivarius* (Fang *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 2008). Takođe, jedan od osnovnih kriterijuma za selekciju probiotika jeste sposobnost adhezije za epitelijalne ćelije intestinalne mukoze, što doprinosi njihovom dužem zadržavanju u GI traktu i produžavanju efekta njihovog delovanja. Adhezija za eukariotske ćelije omogućava bakterijama kolonizaciju određenog staništa, istovremeno, laktobacili kompetirajući za mesta vezivanja, sprečavaju adheziju i aktivaciju patogena. Sledeći ključni kriterijum da bi neki mikroorganizam mogao da bude svrstan u grupu

probiotika, jeste njegova sposobnost da na adekvatan način moduliše imunski odgovor i da pokaže sposobnost uključivanja u metaboličke aktivnosti. U cilju bezbednog korišćenja u ishrani ljudi, veoma je važno pokazati da probiotički sojevi ne poseduju gene odgovorne za faktore virulencije, rezistenciju na antibiotike i antimikrobne lekove (Nueno-Palop and Narbad, 2011; Salminen *et al.*, 1998). Poslednji, ali ne manje važan kriterijum, odnosi se na sposobnost datog mikroorganizma da na zadovoljavajući način može da prođe kroz proces tehnološke obrade i distribucije proizvoda (Dunne *et al.*, 2001). Analizom broja aktivnih ćelija u komercijalnim proizvodima utvrđeno je postojanje znatno manjeg broja živih ćelija u odnosu na broj ćelija predviđen protokolom tehnološkog procesa dobijanja proizvoda. Iako su preživljavanje i održavanje aktivnosti probiotičkih sojeva tokom procesa pripreme i distribucije proizvoda od velikog značaja za njihovo uspešno delovanje, izloženost ćelija liofilizaciji, sušenju i skladištenju u toku dužeg vremenskog perioda, neizbežno dovodi do smanjenja njihove otpornosti na uslove GI trakta. S druge strane, analizom površinskih karakteristika prirodnog i komercijalno dostupnog (u vidu kapsule) probiotičkog soja *Lb. rhamnosus* Lcr35, pokazana je veća sposobnost adhezije komercijalno dostupnog proizvoda za Caco-2 ćelijsku liniju. Dodatno, poređenjem površinskih svojstava analiziranih uzoraka utvrđena je veća hidrofilitnost kapsuliranog proizvoda što je posledica izmenjenih hemijskih svojstava tokom tehnološkog procesa (Nivoliez *et al.*, 2015).

U literaturi se najčešće navodi nekoliko *in vitro* testova koji bi trebalo da se koriste u procesu analize probiotičkih svojstava nekog soja: tolerancija na kiselu sredinu i prisustvo žučnih soli, produkcija antimikrobnih supstanci i sposobnost adhezije za mukus i intestinalne ćelije čoveka (Collins *et al.*, 1998). Testiranja u *in vivo* uslovima podrazumevaju testiranje potencijalnog probiotičkog soja na eksperimentalnim životinjama (najčešće miševi i pacovi, a ređe prasići i/ili svinje što zavisi od namene proizvoda). Tokom testiranja prate se brojni parametri: ponašanje životinja, makroskopski izgled pojedinih organa (želuca, creva, jetre, pankreasa), biohemijski parametri u serumu, uticaj na sadržaj fekalne mikrobiote, adhezivnost i slično. Ukoliko eksperimentalni rezultati *in vivo* testiranja na životinjama, ukažu na moguću probiotičku primenu ispitivanog soja u industriji, potrebno je uraditi propisane *in vivo* testove i na humanoj populaciji (ukoliko je proizvod namenjen humanoj upotrebi). U ovom slučaju ispitanici treba da budu izabrani nasumično, uz neophodnost *placebo* kontrole i dovoljnog broja ispitanika da bi se obezbedila statistička značajnost dobijenih rezultata, a poželjno je da se sva ispitivanja rade u više nezavisnih centara istraživanja (Andersson *et al.*, 2001).

Važno je napomenuti da se poželjne karakteristike potencijalnog probiotičkog soja pokazane u *in vitro* testovima, neće nužno ispoljiti i u *in vivo* istraživanjima na životinjama. Na primer, u *in vitro* eksperimentima pokazano je da soj *Lb. acidophilus* sa najvećom uspešnošću inhibira rast patogenog soja *Staphylococcus aureus* 8325-4, dok u *in vivo* eksperimentima na miševima rast patogenog soja najbolje biva inhibiran sojem *Bifidobacterium bifidum* (Sikorska and Smoragiewicz, 2013).

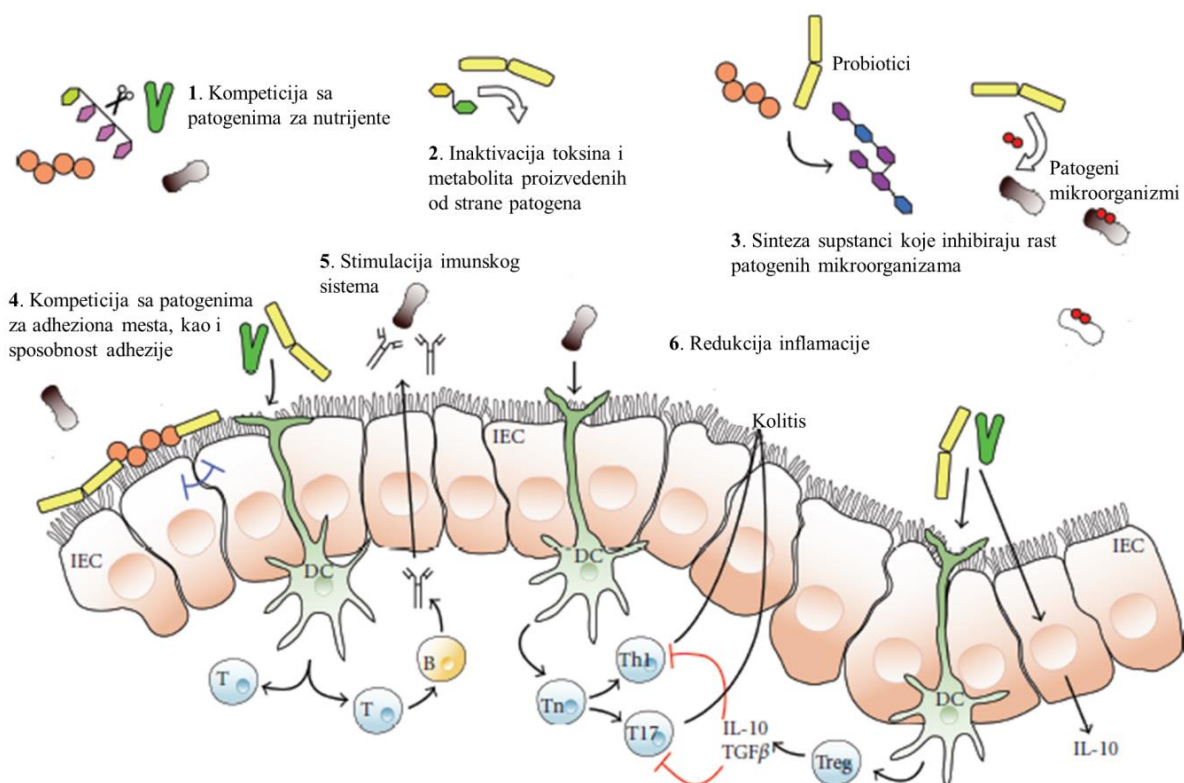
### 1.2.2. Mehanizmi ostvarivanja probiotičkog efekta

Svi do sada pomenuti *in vitro* i/ili *in vivo* eksperimentalni pristupi koji su uključeni u odabir probiotičkog soja u cilju njegove potencijalne aplikacije, istovremeno bi trebali da objasne i fundamentalne mehanizme ostvarivanja njegovog pozitivnog efekta na zdravlje ljudi (Slika 1).

Za neke laktobacile GI trakta životinja i ljudi pokazano je da imaju važnu funkciju u održavanju lokalne mikrobiote i sprečavanju razvoja patogenih mikroorganizama, menjajući pH digestivnog trakta (tj. creva). Pored toga, osnovni mehanizmi na osnovu kojih probiotici ispoljavaju svoj efekat jesu, produkcija antimikrobnih supstanci koje inhibiraju rast patogenih mikroorganizama i inaktivacija toksina i metabolita proizvedenih od strane patogena. Postoje podaci da soj *Lb. casei* DN 114001 vezuje heterociklične aromatične amine i potpomaže digestiju laktoze čime redukuje laktoznu netoleranciju (Nowak and Libudzist, 2009). Poslednjih godina posebno interesovanje postoji za kontrolisanom *in vivo* produkcijom antimikrobnih supstanci u GI traktu čoveka i životinja, od strane probiotičkih sojeva. *In vitro* i *in vivo* studije pokazale su da supernatant soja *Lb. johnsonii* La1 može inhibicijom patogena *Helicobacter pylori* da dovede do supresije i do smanjenja rizika od ponavljanja infekcije (Michetti *et al.*, 1999). Surfaktant soja *Lb. acidophilus*, nakon 3h koinkubacije sa sojevima *S. aureus* i *S. epidermidis*, redukuje broj adheriranih ćelija patogena čak do 56% (Walencka *et al.*, 2008). Pokazano je i da *Lb. fermentum* 104r oslobađa jedinjenja velike molekulske mase (sastavljena od glukoze, N-acetilglukozamina i galaktoze), koja redukuju za oko 50% sposobnost adhezije soja *Escherichia coli* u UG traktu. Pretpostavljeni mehanizam delovanja u pomenutom slučaju podrazumeva specifično vezivanje za glikoproteine mukusa i blokiranje receptornih mesta za adheziju patogena (Ouwehand and Conway, 1996). Sintezom bakteriocina (Abp118) od strane *Lb. salivarius* UCC118, pokazani su pozitivni efekti kod infekcija *Listeria monocytogenes* (Corr *et al.*, 2007). Takođe, za intestinalne laktobacile je pokazano da produkcijom vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ), mlečne kiseline i drugih antimikrobnih



jedinjenja, uspešno suprimiraju rast intestinalnih patogenih i pokazuju širok spektar delovanja na različite sojeve *E. coli* i sojeve rodova *Pseudomonas*, *Proteus*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* i druge. Nakon zajedničke inkubacije soja *Lb. fermentum* NCIMB 7230 koji proizvodi azot-monoksid sa bakterijskim kulturama *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Trichophyton mentagrophytes* i *Trichophyton rubrum*, tokom perioda od 4h do 8h dolazi do potpunog izumiranja svih testiranih patogenih sojeva (Jones *et al.*, 2010).



**Slika 1.** Mehanizam ostvarivanja probiotičkog delovanja: 1 - Kompeticija sa patogenima za nutrijente; 2 - Inaktivacija toksina i metabolita proizvedenih od strane patogena; 3 - Sintaza supstanci koje inhibiraju rast patogena; 4 - Kompeticija sa patogenima za adhezijska mesta, kao i sposobnost adhezije; 5 - Stimulacija imunskog sistema; 6 - Redukcija inflamacije. IEC - intestinalne epitelne ćelije; DC - dendritične ćelije; T - T ćelije. Objasnjenje u tekstu. Modifikovano po O'Toole and Cooney, 2008.

Pozitivan efekat na zdravlje ljudi probiotici ostvaruju i kompeticijom sa patogenima za adhezijska mesta u organizmu. Vaginalni probiotički soj *Lb. pentosus* NCIMB 41114, mehanizmom ekskluzije različitih vrsta roda *Candida*, ostvaruje svoj pozitivni efekat na organizam (Wynne *et al.*, 2006). *Lb. reuteri* ATCC55730 protektivni efekat na keratinocitama ostvaruje inhibicijom adhezije patogenog soja *S. aureus* (Prince *et al.*, 2012). Istim mehanizmom delovanja, adhezija soja *S. aureus* za mukus izolovan iz humanog tkiva

smanjena je za 39-44%, od strane smeše sojeva *Lb. rhamnosus* GG, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i *Propionibacterium freudenreichii* subs. *shermanii* (Vesterlund *et al.*, 2006). Broj vezanih patogenih ćelija sojeva *E. coli* i *Salmonella* spp. redukovan je putem mehanizma kompeticije sa sojevima *Lb. casei* Shirota i *Lb. rhamnosus* GG (testirani su nezavisno) za vezivna mesta na površini Caco-2 ćelijske linije (Lee *et al.*, 2003).

Dodatni način ostvarivanja pozitivnog probiotičkog efekta baziran na eliminaciji patogena iz organizma, pored mehanizma kompeticije za mesta adhezije sa patogenom, jeste sposobnost koagregacije patogena. U tom kontekstu, agregacija potencijalnog probiotičkog soja se može smatrati selektivnim kriterijumom pri biranju probiotika, jer koagregacija probiotika sa intestinalnim patogenima može da dovede do uklanjanja patogenog soja iz GI trakta pojačanom peristaltikom (Schachtsiek *et al.*, 2004). Pokazano je da fenomen koagregacije patogena nije čest mehanizam među laktobacilima koji poseduju sposobnost agregacije. Koagregacija spada u mehanizme specifične za vrstu, kako za probiotički tako i za patogeni soj. Soj *Lb. coryniformis* DSM 20001, koagregira sa sojevima *E. coli* K88, *Campylobacter coli* i *Campylobacter jejuni*, ali ne sa drugim patogenim sojevima čoveka (Schachtsiek *et al.*, 2004). Dodatno, na osnovu eksperimenata baziranim na principima savremene mikroskopije, zapažena je koagregacija vaginalnog soja *S. aureus* sa testiranim sojevima *Lb. jensenii* RC-28 i *Lb. crispatus* 33820 (Younes *et al.*, 2012).

Pokazano je da laktobacili, prisutni kao konstituenti fiziološke mikrobiote, značajno utiču na imunski sistem čoveka, što se posledično odražava na sveopšti zdravstveni status individue. Za mnoge testirane probiotičke sojeve, pokazano je da pored toga što u GI traktu kompetiraju za mesta vezivanja, sprečavaju adheziju i aktivaciju patogena, oni imaju i imunomodulatornu ulogu. Uloga probiotika u imunomodulaciji, zasniva se na sposobnosti probiotičkih sojeva da uspostave ravnotežu između različitih medijatora, koje proizvode subpopulacije efektorskih ćelija imunskog sistema. Eksperimentalni podaci ukazuju na to da *Lb. plantarum* uspešno povećava nivo IL-10 i smanjuju lučenje IL-1 i TNF $\alpha$  u intestinalnim ćelijama (Ng *et al.*, 2009). Pored pomenutog mehanizma imunomodulacije, novija imunološka ispitivanja pokazuju da se probiotički efekat nekih sojeva može pripisati i stimulaciji nespecifičnog imunskog sistema (Parvez *et al.*, 2006; Prescott *et al.*, 1999). Bilo koji od navedenih mehanizama omogućava mikroorganizmima uspešan opstanak na datom staništu, a prvenstveno laktobacili se smatraju bakterijama koje su posebno važne za imunoregulatorne odgovore, za indukovanje dendritskih ćelija i indukciju regulatornih

citokina (npr. IL-10) (Rook and Brunet, 2005). Pokazano da soj *Lb. casei* Shiota proizvodi kapsularne polisaharide (CPS) čija prečišćena frakcija ima supresivni efekat na aktivaciju makrofaga (Yasuda *et al.*, 2008). Signalni putevi pokrenuti u T-ćeliji, prepoznavanjem antigena i kostimulacijom, aktiviraju različite transkripcijske faktore koji posrednički stimulišu ekspresiju gena za citokine. Dendritske ćelije ekspresiraju membranske receptore DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin) pomoću kojih vezuju mikroorganizme, konkretno *Lb. reuteri* i *Lb. casei*, prepoznajući njihov površinski protein (SlpA), što dovodi do indukcije efekatorskih ćelija koje luče IL-10 (Smits *et al.*, 2005). Mutanti *Lb. acidophilus* za SlpA protein, ispoljavaju manji afinitet vezivanja za DC-SIGN receptore (Konstantinov *et al.*, 2008) i pokazuju smanjenu adheziju za Caco-2 ćelije (Buck *et al.*, 2005). Samim tim, onemogućena je normalna indukcija regulatornih citokina. Opisani eksperiment predstavlja direktan dokaz da laktobacili igraju važnu ulogu održavanja citokinskog pro-inflamatornog/anti-inflamatornog profila u organizmu čoveka. Inhibitorski proteini, nazvani I $\kappa$ B, su čvrsto vezani za NF $\kappa$ B (transkripcijski faktor koji reguliše transkripciju više od 60 gena koji su uključeni u inflamatorni odgovor) i na taj način ih održavaju u formi neaktivnih proteinskih kompleksa. Pokazano je da probiotičke bakterije mogu ublažiti pro-inflamatorni odgovor organizma, upravo blokiranjem fosforilacije i poliubikvitinacije inhibitorskog I $\kappa$ B proteina (Neish *et al.*, 2000).

Na kraju, u literaturi se mogu naći i podaci o ostvarivanju probiotičkog efekta mehanizmom regulacije genske ekspresije u eukariotskim ćelijama. Pokazano je da sojevi *Lb. plantarum* 299v i *Lb. rhamnosus* GG uspešno inhibiraju vezivanje patogenog soja *E. coli* za HT-29 intestinalne ćelije koje na svojoj površini ekspresiraju mukus (potvrđen je visok nivo mRNA za MUC2 i MUC3 proteine), ali ne inhibiraju adheziju *E. coli* za HEP-2 ćelije (detektovan je minimalni nivo mRNA za MUC2 protein i odsustvo mRNA za MUC3 protein). S obzirom da je zapaženo da u medijumu obogaćenom MUC2 i MUC3 proteinima, dolazi do inhibicije adhezije testiranog patogenog soja za HEP-2 ćelije, pokazan je značaj prisustva ovih proteina na površini HT-29 intestinalnih ćelija. Inkubacijom soja *Lb. rhamnosus* GG sa HT-29 ćelijama drastično se povećava nivo mRNA za MUC2 i MUC3 proteine. Iz ovih eksperimenata proizlazi zaključak da je sposobnost probiotičkih bakterija da inhibiraju adheziju patogenih sojeva za ćelije domaćina, posredovana njihovom sposobnošću modulacije genske ekspresije MUC2 i MUC3 crevnih mucina (Mack *et al.*, 1999). Slična studija, rađena na Caco-2 intestinalnim ćelijama, u kojoj je kao probiotički soj korišćen *Lb.*

---

*rhamnosus* GG, a kao patogeni soj korišćen je *Clostridium difficile*, potvrdila je zaključke prethodne grupe autora (Mattar *et al.*, 2002).

### 1.2.3. Bakterije roda *Lactobacillus* kao probiotici

Delovanjem probiotika značajno se može menjati postojeća ravnoteža bakterijske mikrobiote. Upravo, ovo svojstvo ih izdvaja u grupu organizama koji dobijaju sve veću industrijsku i medicinsku primenu te samim tim imaju sve veći potencijal u fundamentalnom istraživanju. Sojevi laktobacila imaju prednost, u odnosu na ostale probiotičke mikroorganizme, zato što se koriste za proizvodnju fermentisanih proizvoda i na taj način se kroz ishranu mogu jednostavno uneti u organizam. Ipak, svaki potencijalni probiotički soj mora biti nezavisno determinisan i okarakterisan, a jedino jasno definisani sojevi, koji zadovoljavaju sve kriterijume za odabir probiotika, mogu biti uključeni u ispitivanja na laboratorijskim životinjama.

Iako je broj kliničkih dokaza o pozitivnom uticaju probiotika u porastu, još uvek na tržištu postoji mali broj probiotičkih preparata. Komercijalno važni probiotici koji su na tržištu, uglavnom pripadaju predstavnicima roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Za pojedine okarakterisane predstavnike laktobacila (*Lb. acidophilus* LA1, *Lb. acidophilus* NCFB1748, *Lb. rhamnosus* GG ATCC53013, *Lb. casei* Shirota, *Lb. gasseri* (ADH) i *Lb. reuteri*) ustanovljeni su pozitivni probiotički efekti (Lee and Salminen, 1995). Istraživanja koja su usledila kasnije, proširila su spisak probiotičkih sojeva laktobacila koji se koriste za zdravstvenu modulaciju (Goel *et al.*, 2006).

Pored brojnih tehnoloških prednosti, sojevi roda *Lactobacillus* imaju prednost i sa aspekta zdravstvene bezbednosti upotrebe probiotika, s obzirom da su patogeni predstavnici ovog roda veoma retki. Najpoznatiji komercijalno dostupni probiotički sojevi su: *Lb. rhamnosus* GG (Saxelin, 1997), *Lb. casei* Shirota (Spanhaak *et al.*, 1998) i *Lb. acidophilus* LA-1 (Bernet *et al.*, 1994). Takođe, *Lb. rhamnosus* GR-1 i *Lb. fermentum* RC-14, koji se koriste u lečenju infekcija urinarnog trakta, dovode do smanjenja broja koliformnih bakterija i gljivica u vagini kao i da kod bakterijskih vaginoza restauriraju normalnu vaginalnu mikrobiotu u 81% slučajeva u poređenju sa 50% kod *placebo* grupe žena (Reid *et al.*, 2001).

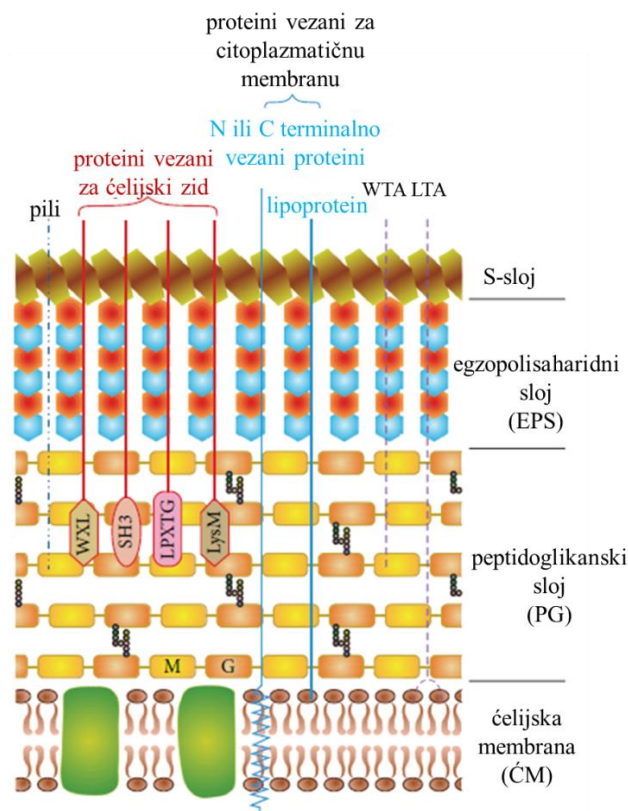
### 1.3. Površinske karakteristike bakterija roda *Lactobacillus*

#### 1.3.1. Površinske karakteristike bakterija roda *Lactobacillus* - kratak pregled

Odgovor bakterija na uticaj različitih sredinskih faktora u sredini koja ih okružuje i njihova međusobna komunikacija zavisi od procesa koji se odvijaju na površini njihovih ćelija. S obzirom na sve veći broj mogućnosti primene bakterija roda *Lactobacillus*, ne samo u prehrambenoj industriji, već i u medicinske svrhe, potrebno je što bolje okarakterisati komponente koje čine površinski sloj ovih bakterija.

Veoma raznolika struktura bakterijskih površinskih molekula laktobacila velikim delom reflektuje adaptacije ovih mikroorganizama na specifične sredinske uslove i od suštinske je važnosti za brojne aspekte njihovog života. Fizičko-hemijske osobine i hemijski sastav površinskih molekula imaju uticaj na razmenu nutrijenata između bakterija i sredine, kao i na rezistenciju na spoljašnji stres izazvanu mehaničkim, hemijskim, toplotnim i osmotskim faktorima (Schär-Zammaretti and Ubbnik, 2003).

Gram-pozitivne bakterije imaju ćelijski zid jednostavne građe (Slika 2), koji se sastoji od komponenti čiji je glavni konstituent polisaharid peptidoglikan (PG). Druga komponenta ćelijskog zida, teihoična kiselina (teichoic acids - TA), najčešće se kovalentno vezuje za PG (wall TA - WTA). Teihoična kiselina je relativno kratak polimer, koji se može naći povezan i sa citoplazmatičnom membranom u formi lipoteihoične kiseline (LTA) (Navarre and Schneewind, 1999). Druge komponente ćelijskog zida Gram-pozitivnih bakterija, kao što su teihoureična kiselina i lipoglikani, koje su za peptidoglikan vezani fosfodiastarskim vezama (Navarre and Schneewind, 1999), a koji se jednim imenom zovu sekundarni polimeri ćelijskog zida, variraju u znatnoj meri u zavisnosti od vrste bakterija (Delcour *et al.*, 1999).



**Slika 2.** Shematski prikaz površinskih proteina laktobacila. ĆM - ćelijska membrana; glavni gradivni konstituent ćelijskog zida je polisaharid peptidoglikan koji formira peptidoglikanski sloj (PG). Druga komponenta ćelijskog zida je teihoična kiselina koja može biti kovalentno vezana za peptidoglikan (WTA) ili kovalentno vezana sa citoplazmatičnom membranom (LTA). Često se na površini laktobacila nalaze egzopolisaharidi (EPS), parakristalni S-sloj proteina (S-sloj), pili, proteini koji su vezani za ćelijski zid kovalentnim vezama (LPXTG) i nekovalentnim vezama (poseduju WXL, SH3 i LysM motive), kao i proteini koji su vezani za ćelijsku membranu (N- ili C- terminalno vezani proteini i lipoproteini). Objasnjenje u tekstu. Modifikovano po Sengupta *et al.*, 2013.

Proteini predstavljaju 5-10% ukupne mase ćelijskog zida i nalaze se na spoljnoj strani determinišući antigene karakteristike bakterija. Proteini na površini bakterija mogu da budu:

- a) Proteini koji se sekretuju u spoljašnju sredinu. Ovi proteini imaju signalni (lider) peptid koji im pomaže u migraciji do ćelijske površine, a koji signalna peptidaza uklanja nakon njihove translokacije kroz membranu. Poznata su dva tipa sekrecionih sistema: takozvani ATP-zavisni generalni sekretorni put (GSP) i specifični proteinski put za eksport (na primer Tat put). Specifičnim ABC transporterima sekretuju se proteini koji nemaju signalne peptide (Sánchez *et al.*, 2008).

- b) Proteini vezani za ćelijski zid ili citoplazmatičnu membranu zahvaljujući specifičnim domenima, bilo kovalentnim ili nekovalentnim hemijskim vezama.
- Grupu proteina vezanih za ćelijsku površinu kovalentnim hemijskim vezama čine proteini sa LPXTG motivom (sortaza-zavisi površinski proteini) i lipoproteini (koji imaju N-terminalnu lipobox motiv sekvencu (LXXC) koja im omogućava vezivanje za lipide citoplazmatične membrane (Sutcliffe and Harrington, 2002).
  - Grupu proteina vezanih za ćelijsku površinu nekovalentnim hemijskim vezama čine proteini koji poseduju N- ili C-terminalne transmembranske delove koji se sastoje od hidrofobnih aminokiselina koje omogućavaju ukotvljavanje u membranu bakterije (Bath *et al.*, 2005). Ovoj grupi pripadaju i proteini koji sadrže LysM tip ponovaka, SH3 domen, kao i proteini koji poseduju WXL motive na C-terminusu (Chapot-Chartier and Kulakauskas, 2014).
- c) Proteini koji nemaju specifične domene, a u vezi su sa bakterijskom površinom ili se oslobađaju u ekstraćelijsku sredinu, zovu se neukotvljeni (anchorless) multifunkcionalni proteini (ili moonlight proteini) (Sánchez *et al.*, 2008).
- d) Kod nekih vrsta postoji i spoljni sloj proteina pakovanih u parakristalni S-sloj (S-layer). S-sloj čine mali proteini (40-60 kDa), nekovalentno vezani za ćelijski zid bakterija i često ga u potpunosti prekrivaju (Avall-Jaaskelainen and Palva, 2005).

Bakterijski polisaharidi se razlikuju po sastavu, veličini i mestu grananja, što u velikoj meri doprinosi strukturnoj raznolikosti površinskih molekula laktobacila (Lebeer *et al.*, 2008). Površinske komponente bakterijskih ćelija mogu da formiraju sloj koji je slabije vezan za ćelijsku površinu, sloj ekstracelularnih polisaharida (EPS) i sloj kapsularnih polisaharida, koji su najčešće kovalentno vezani za PG i čine gustu polisaharidnu ovojnica oko ćelije. Važno je istaći da sastav, veličina i svojstva površinskih polisaharida zavise od uslova rasta date bakterijske vrste.

### 1.3.2. Faktori koji doprinose adheziji bakterija roda *Lactobacillus* u GI traktu

Površinske osobine laktobacila su značajne kako u procesu proizvodnje hrane, tako i za njihovu adheziju u GI traktu što je preduslov za ispoljavanje njihovog ukupnog pozitivnog zdravstvenog uticaja. Ovaj uticaj se najčešće ogleda u smanjivanju broja crevnih patogenih bakterija, s obzirom da su probiotički mikroorganizmi često antagonisti patogena, jer kompetiraju kako za nutrijente tako i za vezivna mesta na intestinalnim ćelijama GI trakta (Castagliuolo *et al.*, 2005). Sposobnost adhezije omogućava bakterijama ne samo

kolonizaciju određenog staništa, već i održavanje u njemu duže vreme (Muñoz-Provencio *et al.*, 2009).

U literaturi se može naći veliki broj podataka o fizičko-hemijskim faktorima koji utiču na sposobnost i stepen adhezije bakterija za intestinalne ćelije u GI traktu. Interesantno, u toku rasta sojeva *Lb. acidophilus* i *Lb. fermentum*, dolazi do morfoloških promena ćelija i kolonija. Neposredno nakon izolovanja iz GI trakta čoveka ćelije ovih bakterija su pojedinačne, hrapave površine, tanke i filamentozne. U modifikovanim uslovima gajenja (kao što je dodatak CaCl<sub>2</sub>), dolazi do morfološki vidljivih promena, odnosno ćelije su vrlo kratke i glatke, povezane u lance. Zapaženo je da ćelije koje poseduju izmenjeni fenotip pokazuju znatno veću otpornost i adherentost za crevni epitel (Henriksson *et al.*, 1991). Slično prethodnom primeru, soj *Lb. farciminis* CNCM I-3699 poseduje dva tipa morfološki različitih kolonija: blede bele, grube kolonije (R fenotip) i svetlo bele, glatke kolonije (S fenotip). Primećena je značajno veća sposobnost formiranja agregata i modifikovana sinteza egzopolisaharida od strane kolonija R fenotipa u odnosu na S fenotip (Tareb *et al.*, 2015). Nedavno je pokazano da površinske osobine *Lb. acidophilus* NCC2628, uključujući interakcije sa ćelijama GI trakta, zavise od sastava medijuma u kome se gaje (Schär-Zammaretti *et al.*, 2005). Fizičko-hemijske osobine površinskih bakterijskih molekula, kao što je hidrofobnost, takođe mogu uticati na adheziju za mukozne površine ljudi. U velikom broju radova se navodi LTA kao glavna komponenta koja utiče na hidrofobnost što posledično doprinosi adheziji sojeva *Lb. johnsonii* (Granato *et al.*, 1999), *Lb. rhamnosus* (Lebeer *et al.*, 2007) i *Lb. reuteri* (Walter *et al.*, 2007).

Kako se vidi iz prethodno navedenih rezultata, fizičko-hemijski faktori u velikoj meri utiču na adhezivnost bakterija, dok dodatno prisustvo velikog broja različitih adhezivnih molekula na površini laktobacila ukazuje na postojanje još šireg spektra različitih tipova adhezije bakterija za intestinalne ćelije u GI traktu. Predstavnici glavnih grupa adhezivnih faktora na površini laktobacila su:

- **Proteini S-sloja.** Vezivanje za komponente ekstraćelijskog matriksa (Extracellular matrix, ECM) koga čine kolagen, fibronektin i laminin, je opisano kod soja *Lb. crispatus* JCM 5810, a postiže se posredstvom CbsA proteina S-sloja (Sillanpaa *et al.*, 2000). S-sloj protein soja *Lb. crispatus* ZJ001 odgovoran je za adheziju ovog soja, zbog čega posledično dolazi do inhibicije adhezije patogenih sojeva *E. coli* O157:H7 i *Salmonella typhimurium* (Chen *et al.*, 2007). Pokazano je da protein



- S-sloja (~ 45 kDa) soja *Lb. acidophilus* M92 doprinosi njegovoj adheziji za epitelne ćelije tankog i debelog creva kod miševa (Frece *et al.*, 2005).
- **Agregacioni faktori.** Posebna grupa površinskih proteina su tzv. agregacioni faktori koji obezbeđuju sposobnost agregacije bakterija na čijoj su površini ekprimirani. Formiranje agregata laktobacila je bitno za kolonizaciju usne duplje (Kolenbrander, 2000), creva (Jankovic *et al.*, 2003) i UG trakta (Reid *et al.*, 1990).
  - **Mukus vezujući proteini.** Široka distribucija bakterijskih proteina koji se vezuju za mukus (Mucus-binding proteini - Mub) ukazuje na to da ovi proteini igraju glavnu ulogu u adheziji za mukozne površine GI trakta, interagujući sa specifičnim muko-oligosaharidima. Pokazano je da mutanti za Mub protein soja *Lb. acidophilus* ispoljavaju smanjenu adheziju za Caco-2 intestinalne ćelije (Buck *et al.*, 2005). Nekoliko nezavisnih istraživanja rađenih na sojevima *Lb. rhamnosus*, *Lb. reuteri*, *Lb. plantarum* pokazala su potencijalnu ulogu pomenutih proteina u vezivanju za mukus (Boekhorst *et al.*, 2006; MacKenzie *et al.*, 2010; Von Ossowski *et al.*, 2011).
  - **Proteini uključeni u vezivanje za ECM (kolagen/fibronektin vezujući proteini).** Vezivanje kolagen-vezujućeg proteina (CnBP) soja *Lb. reuteri* NCIB 11951 za kolagen tipa I ima bitnu ulogu u adheziji za intestinalne ćelije (Aleljung *et al.*, 1994). Poređenjem stepena vezivanja soja *Lb. casei* BL23 koji na površini eksprimira fibronektin vezujući protein (FbpA) i mutanta kod koga je inaktiviran *fbpA* gen, pokazan je značaj prisustva fibronektin-vezujućeg proteina prisutnog na površini soja *Lb. casei* BL23 u vezivanju za matriks, odnosno u vezivanju za epitelijalne ćelije intestinalne mukoze (Muñoz-Provencio *et al.*, 2010). Kolagen i fibronektin vezujući proteini mogu biti prisutni istovremeno na površini bakterijskih ćelija. Pokazano je da soj *Lb. acidophilus* CRL 639 na svojoj površini eksprimira proteine veličine 45 i 58 kDa koji su odgovorni za vezivanje za imobilisani kolagen tipa I, dok se protein veličine 15 kDa specifično vezuju za imobilisani fibronektin (Lorca *et al.*, 2002).
  - **Pili.** Elektronska mikroskopija soja *Lb. rhamnosus* GG, pokazala je prisustvo končastih izraštaja na površini ćelija koji su proteinske prirode, pili. Analizom uloge pila pokazano je da imaju doprinos u interakciji *Lb. rhamnosus* GG sa mukusom domaćina (Kankainen *et al.*, 2009). Pili kao površinske proteinske ekstenzije karakteristika su uglavnom Gram-negativnih patogenih bakterija i

predstavljaju virulentne faktore koji promovišu adheziju za mukozne površine domaćina.

- **Ne-proteinski adhezini (lipoteihoična kiselina, polisaharidi).** LTA na površini soja *Lb. reuteri* 100-23 omogućava kolonizaciju GI trakta kod miševa (Walter *et al.*, 2007). Eksperimentalno je pokazano da EPS koje proizvodi *Lb. rhamnosus* imaju ulogu u adheziji (Ruas-Madiedo *et al.*, 2006). Slični eksperimenti koji su rađeni sa sojem *Lb. acidophilus*, proizvođačem EPS-a, potvrđuju funkciju polisaharida u adheziji (Lorca *et al.*, 2002). Izogeni mutant soja *Lb. rhamnosus* GG koji ne proizvodi EPS bogat galaktozom, pokazuje smanjeno vezivanje i održanje u mišijem GI traktu u odnosu na parentalni *Lb. rhamnosus* GG kod koga produkcija EPS-a nije narušena (Lebeer *et al.*, 2011).

Jedna obimna studija u kojoj je analizirano prisustvo adhezivnih molekula obuhvatila je 156 izolata laktobacila izolovanih iz tradicionalnih fermentisanih proizvoda. Prisustvo gena za pet najčešće zastupljenih adhezivnih molekula prema literaturnim podacima (*apf*, *cnb*, *fpbA*, *mapA*, *mub*) detektovano je od 86% do 100 %, a prisustvo gena za ređe opisane adhezine (*cbsA*, *gtf*, *msa*, *slpA*) detektovano je od 0% do 8%. Na osnovu ovih rezultata dobijen je veliki broj različitih genetičkih profila na osnovu kojih se može zaključiti da su adhezivni molekuli kod laktobacila prisutni u velikom procentu (Turpin *et al.*, 2013). Veoma često, laktobacili na svojoj površini eksprimiraju više različitih tipova adhezina u isto vreme, čime obezbeđuju opstanak u datoj sredini. Na primer, soj *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 koji proizvodi EPS u velikoj količini, ispoljava sposobnost autoagregacije i odlikuje se izraženom hidrofobnošću ćelija (Aslim *et al.*, 2007).

Bioinformatičkim pristupom poređene su celokupne genomske sekvence najpotentnijeg probiotičkog soja *Lb. rhamnosus* GG i njemu najbližijeg soja po mikrobiološkim i molekularnim karakteristikama, LC705 (oba genoma su veličine oko 3,0 Mbp). Dobijeni rezultati ukazivali su na prisustvo rasutih sekvenci po genomu soja *Lb. rhamnosus* GG koje kodiraju za oko 80 proteina, a koje izostaju kod soja LC705. Analizom svih 80-ak proteina, pokazano je da određen broj pripada proteinima koji na indirektan (proteini koji su esencijalni za biosintezu egzopolisaharida) ili direktan (pili) način doprinose adhezivnosti soja *Lb. rhamnosus* GG (Kankainen *et al.*, 2009).

### 1.3.2.1. Sposobnost formiranja biofilma bakterija roda *Lactobacillus*

U svim prirodnim ekosistemima, uključujući i organizme ljudi i životinja, bakterije pokazuju tendenciju vezivanja za površine i formiranja struktura poznatih pod nazivom biofilm (Kolter and Greenberg, 2006). Brojni su podaci u literaturi o sposobnosti formiranja biofilma kod patogenih bakterija, s obzirom da ovo svojstvo predstavlja virulentni faktor koji promoviše njihovu adheziju za površine domaćina u inicijalnim fazama infekcije, a sa druge strane povećava otpornost patogena na stres i terapijske tretmane. Međutim, sposobnost formiranja biofilma daje brojne prednosti i BMK, kako u procesu proizvodnje fermentisanih proizvoda tako i u prijanjanju za komponente ECM-a u crevima (Branda *et al.*, 2005; Furukawa, 2015; Kolter and Greenberg, 2006).

Utvrđeno je da soj *Lb. rhamnosus* GG, pored brojnih adhezina eksprimiranih na površini, poseduje i sposobnost formiranja biofilma na abiotičkim površinama u odnosu na sojeve *Lactobacillus casei* grupe koji su testirani pod istim uslovima. *In vitro* ekperimentima pokazano je da stepen sposobnosti formiranja biofilma soja *Lb. rhamnosus* GG direktno zavisi od sastava medijuma za rast i faktora koji su povezani sa uslovima u GI traktu (niska pH vrednost, visok osmolaritet, prisustvo žuči, mucina i nedigestibilnih polisaharida). U cilju karakterizacije površinskog molekula koji učestvuje u sposobnosti formiranja biofilma, praćene su fenotipske karakteristike mutanata u genima za sintezu egzopolisaharida (*wzb*), lipoteihoičnu kiselinu (*dltD*) i jednu od komponenti metaboličkog puta bakterija (*luxS*), nakon čega je ukazano na njihovu važnu ulogu u procesu formiranja biofilma (Lebeer *et al.*, 2007). Broj bakterijskih vrsta, način i uslovi formiranja bifilma, kao i njegov sastav, veoma su varijabilni i zavise od molekula prisutnih na površini bakterija (Branda *et al.*, 2005). Na primer, nedavna istraživanja hemijskog sastava biofilma pokazala su da biofilm formiran od strane vaginalnog izolata *Lb. reuteri* CRL 1324 je isključivo proteinske prirode, dok se biofilm formiran od strane soja *Lb. rhamnosus* CRL 1332 sastoji od ugljenih hidrata i proteina (Leccese Terraf *et al.*, 2016).

### 1.3.3. Agregacioni faktori bakterija roda *Lactobacillus*

Autoagregacija se može definisati kao specifičan rast bakterijskih ćelija istog soja koje se u tečnoj kulturi nalaze grupisane na dnu epruvete u odnosu na bakterijski soj koji nema sposobnost autoagregacije i ima homogeno raspoređene ćelije u tečnoj kulturi. Ova fenotipska karakteristika bakterija se može javiti i u obliku koagregacije pri čemu dolazi do

---

uspostavljanja kontakta između ćelija različitih bakterijskih vrsta koje se nalaze raspoređene u tečnoj kulturi na dnu epruvete (Roos *et al.*, 1999).

Veličina i osobine do sada opisanih agregacionih faktora laktobacila variraju od hidrofilnog peptida veličine 2 kDa koji sintetiše soj *Lb. gasseri* (Boris *et al.*, 1997) do površinskih proteina većih od 200 kDa kod *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 (Lozo *et al.*, 2007). Unutar navedenog opsega veličine agregacionih faktora, opisani su i brojni drugi molekuli koji doprinose ovom svojstvu bakterija. Autoagregaciju soja *Lb. coryniformis* DSM 20001T omogućava Cpf protein (19,9 kDa) (Schachtsiek *et al.*, 2004). Kod soja *Lb. acidophilus* NCFM opisan je Apf protein koji učestvuje u agregaciji (21 kDa) (Goh and Klaenhammer, 2010), dok AggH protein (56 kDa) obezbeđuje agregaciju soja *Lb. reuteri* ATCC 53608 (Roos *et al.*, 1999). Soj *Lb. gasseri* 4B2 na svojoj površini eksprimira dva esencijana proteina za bakterijsku ćeliju, Apf1 i Apf2 proteini (32 kDa i 28 kDa), čijom mutacijom gena dolazi do drastičnih promena u ćelijskom obliku, ali ne utiču na sposobnost agregacije (Jankovic *et al.*, 2003). Uporednom analizom organizacije *apf1* i *apf2* gena, analizom aminokiselinskog sastava i fizičko-hemijskih osobina Apf1 i Apf2 proteina, pokazano je da postoji određen stepen sličnosti između njih i proteina S-sloja (Ventura *et al.*, 2002).

Agregacija se može smatrati jednim od selektivnih kriterijuma pri biranju probiotika, s obzirom da ima bitnu ulogu u međubakterijskoj interakciji, u interakciji sa epitelijalnim ćelijama GI trakta i doprinosi sposobnosti bakterija da se adsorbuju na različite površine što je važna osobina koja im omogućuje uspešnu kolonizaciju staništa.

U literaturi se mogu naći brojna istraživanja vezana za molekularnu i funkcionalnu karakterizaciju agregacionih faktora laktobacila, ali se o njihovom preciznom mehanizmu ostvarivanja pozitivnog probiotičkog efekta i dalje veoma malo zna. Veoma jednostavnim i nedvosmislenim eksperimentima demonstriran je značaj prisustva agregacionog faktora na površini analiziranih sojeva u početnim koracima kolonizacije, odnosno u vezivanju za epitelijalne ćelije intestinalne mukoze. Pokazano je da se soj *Lb. crispatus* koji poseduje sposobnost agregacije u većem stepenu vezuje za Caco-2 ćelijsku liniju i omogućava kolonizaciju GI trakta *in vivo* u odnosu na njegov derivat koji ne agregira (Cesena *et al.*, 2001). Takođe, *Lb. crispatus* M247 bolje preživljava u debelom crevu od svog mutanta MU5 koji je izgubio sposobnost agregacije (Voltan *et al.*, 2007). Kod mutanta soja *Lb. acidophilus* NCFM za već gore pomenuti Apf protein ( $\Delta apf$ ), zapaža se smanjena stopa preživljavanja u

simuliranim uslovima GI trakta, kao i manji stepen adhezije za Caco-2 ćelijsku liniju u odnosu na parentalni soj (Goh and Klaenhammer, 2010). Sposobnost ispoljavanja agregacije vaginalnog izolata *Lb. plantarum* CMPG5300 u vezi je sa sortaza-zavisnim proteinima (SDPs). Pomenuti soj pokazuje visok stepen autoagregacije i adhezije u odnosu na mutantni soj u *srtA* genu čiji je proteinski produkt neophodan za kovalentno vezivanje proteina sa LPXTG motivom (sortaza-zavisni proteini) za ćelijsku površinu i posledično ostvarivanje aktivnosti SDPs koja se ogleda u sposobnosti soja CMPG5300 da agregira (Malik *et al.*, 2013).

Pokazano je da stepen autoagregacije sojeva *Lb. plantarum* IFPL33, IFPL81, IFPL150, IFPL156 i IFPL162 pozitivno korelira sa stepenom koagregacije sa svim testiranim patogenim sojevima, iako je često sposobnost koagregacije specifično svojstvo kako za laktobacile tako i za patogeni soj. Međutim, nije primećena korelacija autoagregacije i koagregacije sa hidrofobnošću površinskih molekula (afinitet za ksilen) i sa sposobnošću adhezije laktobacila i inhibicije adhezije patogena za Caco-2 ćelijsku liniju ni kod ijednog od testiranih sojeva. Navedeni rezultati ukazuju na mogućnost da sposobnost autoagregacije i hidrofobnost bakterijskih ćelija ne moraju neizostavno biti odgovorni za adheziju bakterija ili inhibiciju adhezije vezivnih mesta patogenog soja. Naime, rezultati istraživanja ukazuju da je mehanizam interakcije bakterijskih ćelija sa domaćinom veoma kompleksan i najverovatnije multifaktorijalan proces (Garsia-Cayuela *et al.*, 2014).

Fenomenu autoagregacije doprinose i drugi adhezivni molekuli na površni laktobacila, kao i brojni faktori iz spoljašnje sredine. Na primer, sposobnosti agregacije i formiranju biofilma znatno doprinose i egzopolisaharidi soja *Lb. reuteri* TMW1.106 (Walter *et al.*, 2008), a skorija istraživanja pokazala su da SpaC protein, glavni konstituent pila, doprinosi autoagregaciji soja *Lb. rhamnosus* GG (Tripathi *et al.*, 2013). Osnovni faktori spoljašnje sredini koji utiču na ekspresiju agregacionih faktora na površini bakterija su temperatura, faza fermentacije, pH i sastav medijuma, nivo rastvorenog kiseonika, prisustvo jona metala i slično. Pokazano je da se stepen autoagregacije vaginalnog izolata *Lb. johnsonii* CRL 1294 povećava sa smanjenjem inicijalne pH vrednosti medijuma za rast (Juarez Tomas *et al.*, 2005). Neki od navedenih faktora utiču na sposobnost agregacije modulacijom hidrofobnih karakteristika površinskih molekula bakterija.

Pored laktobacila, agregacioni faktori prisutni su i kod predstavnika drugih rodova BMK. Sposobnost agregacije soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1 obezbeđena je

zahvaljujući prisustvu AggL - laktokokalnog agregacionog faktora (Kojic *et al.*, 2011). Interakcija soja *Enterococcus faecalis* sa renalnim tubulnim ćelijama posredovana je agregacionom supstancom koja se, pre svega, pominje kao ključni faktor adhezije enterokoka za površinu ćelija domaćina (Kreft *et al.*, 1992). Dodatno, agregacija je fenomen prisutan i kod Gram-negativnih patogenih bakterija, a proteini koji doprinose ovom svojstvu predstavljaju virulentne faktore koji doprinose adheziji za epitelijalne ćelije domaćina. Na primer, *Pseudomonas aeruginosa* brzo nakon vezivanja za površinu epitelijalnih ćelija, formira međućelijske komplekse tj. autoagregate, koji kao takvi bivaju internalizovani u ćelije domaćina (Lepanto *et al.*, 2014). Ekspresija Sbp proteina, veličine 18 kDa, na površini ćelija soja *S. epidermidis* doprinosi njihovoj agregaciji što je osnovni preduslov za formiranje višeslojnog biofilma čime se postiže uspešna invazija patogenog soja (Decker *et al.*, 2015).

#### **1.4. Uloga bakterija roda *Lactobacillus* u prevenciji i poboljšanju simptoma različitih zdravstvenih problema**

Posebna pažnja u istraživanju, posvećena je ulozi laktobacila u prevenciji i lečenju enteričnih infekcija (Lebeer *et al.*, 2008). Pokazani su pozitivni probiotički efekti soja *Lb. salivarius* (Aiba *et al.*, 1998) i *Lb. acidophilus* LB (Coconnier *et al.*, 1997) kod infekcija *H. pylori*. Ustanovljen je delotvorni efekat laktobacila u akutnim dijarejama, kao i u inflamatornim bolestima creva, kao što je iritabilni crevni sindrom (Sazawal *et al.*, 2006). Veliki broj istraživača ukazuje na pozitivan efekat probiotičkih kultura u lečenju Kronove bolesti, blokiranjem produkcije inflamatornih citokina u T-limfocitima (Clavel and Haller, 2007). Jedan od značajnijih pozitivnih efekata koji ostvaruju probiotički sojevi roda *Lactobacillus* jeste normalizacija bakterijske populacije mikrobiota tokom postantibiotskih sindroma (Song *et al.*, 2010). Takođe, brojni su dokazi o pozitivnom efektu laktobacila u tretmanu urogenitalnih infekcija različitim vrstama patogena. Utvrđeno je da soj *Lb. paracasei* CRL1289 inhibira rast *S. aureus* u UG traktu miševa (Zarate *et al.*, 2007), dok primenom soja *Lb. fermentum* Ess-1 u tretmanu urogenitalnih infekcija kod žena pokazana je antifungalna aktivnost prema soju *Candida albicans* (Rönnqvist *et al.*, 2007). Osim ostvarivanja pozitivnog efekta u GI i UG traktu, laktobacili pokazuju veoma zavidne efekte i u oblasti prevencije atopičnih bolesti, preosetljivosti i alergija na hranu (Boyle and Tang, 2006). Iako ima malo podataka o probiotičkoj aktivnosti laktobacila u usnoj duplji, pokazano je da vrste roda *Lactobacillus* poreklom iz GI trakta mogu ostvariti pozitivne efekte u usnoj duplji mehanizmom inhibicije kariogenih streptokoka i kandidate (Marchant *et al.*, 2001).

Pored navedenog, postoje *in vivo* ekperimentalni dokazi o smanjenju holesterola u serumu nakon unošenja probiotičkih laktobacila u organizam. *Lb. casei* ASCC290, *Lb. casei* ASCC2292 i *Lb. acidophilus* ATCC4962 snižavaju holesterol i trigliceride tako što vrše asimilaciju lipida vezivanjem za površinu ćelija i inkorporaciju u ćelijske membrane (Liong, 2006). U drugom slučaju, probiotičke bakterije mogu da vrše dekonjugaciju žučnih soli, što za posledicu ima smanjenje njihovog delovanja u apsorpciji lipida (i holesterola) u GI traktu i povećanje ekskrecije žučnih soli iz GI trakta. U sledećem koraku, navedena eliminacija žučnih soli uzrokuje potrebu za sintezom novih količina u organizmu za šta je neophodan holesterol kao prekursor (Pereira and Gibson, 2002; Usman, 1999). Postoje literaturni podaci da sedmodnevni tretman miševa, sojem *Lb. reuteri* CRL 1098, u optimalnoj dozi, dovodi do snižavanja ukupnog holesterola u organizmu za 38% (Kaur *et al.*, 2002). S obzirom da je kod velikog broja kardiovaskularnih oboljenja pacijenata utvrđena pozitivna korelacija sa nivoom holesterola i triglicerida, ne treba isključiti mogućnost primene probiotičkih laktobacila u prevenciji i terapiji kardiovaskularnih oboljenja i redukovanju ateromatoznih plaka (Naruszewicz *et al.*, 2002).

Modulacijom signalnih puteva u epitelnim ćelijama GI trakta, probiotičke bakterije mogu omogućiti oporavak oštećenog epitela i sprečiti apoptozu okolnih ćelija. Nakon inkubacije *Lb. rhamnosus* GG sa mišjim ćelijama debelog creva, potvrđena je povećana aktivacija anti-apoptotske Akt/protein kinaze B i inhibicija aktivacije pro-apoptotske p38/mitogen-aktivirajuće protein kinaze (Yan and Polk, 2002). Skorija istraživanja ukazuju na antimutagenu aktivnost laktobacilusnih probiotičkih sojeva, posredovanu površinskim polisaharidnim molekulima. Naime, *Lb. plantarum* 301102S sintetiše egzopolisaharide koji imaju funkciju, najpre, vezivanja hemijskih mutagena, a potom, olakšavanja njihove ekskrecije iz organizma (Tsuda *et al.*, 2008). U eksperimentima u kojima je grupa pacova istovremeno tretirana bisfenolom i hranjena probiotičkim bakterijskim sojem *Lb. casei* Shirota, zapaženo je povećano izlučivanje bisfenola u fecesu, u odnosu na kontrolne jedinke. Ovim je pokazana jedna od funkcija bakterijskih polisaharidnih molekula, odnosno njihova uloga u vezivanju karcinogena (Oishi *et al.*, 2008).

Zbog svega navedenog, postoji sve veće interesovanje za upotrebu laktobacila kao probiotika u cilju obnavljanja i održavanja normalne crevne i vaginalne mikrobiote i prevencije ili sprečavanja ponovnog nastanka različitih infekcija izazvanih patogenim mikroorganizmima, kao i u prevenciji brojnih drugih oboljenja.

### 1.5. Prirodni izolati bakterija roda *Lactobacillus*

Tradicionalni mlečni proizvodi koji se prave u domaćinstvima na specifičnim ekološkim lokalitetima po recepturama starim stotinama godina predstavljaju važan izvor autohtonih vrsta i sojeva BMK. U proizvodnji se koriste kravlje, kozije ili ovčije mleko (posebno ili njihove mešavine u različitom odnosu) bez korišćenja starter kultura. Većina proizvoda se pravi od nepasterizovanog mleka, tako da raznovrsnost BMK koje su prisutne u proizvodu zavisi od mikrobiološke zajednice sredine i specifične mikrobiote svežeg mleka. Istraživanje biodiverziteta BMK je od velikog značaja u pronalaženju sojeva sa različitim karakteristikama od značaja za industriju. Upravo zbog pomenutog, BMK poreklom iz tradicionalnih proizvoda mogu naći široku primenu u industriji hrane zbog davanja specifičnog ukusa, arome, teksture i hranljivih vrednosti proizvoda (McKay and Baldwin, 1990).



## **2. CILJ RADA**

## 2. CILJ RADA

U poslednje vreme, sve je više podataka o pozitivnim efektima laktobacila na zdravlje ljudi, pa se javlja potreba za izolovanjem i karakterizacijom potencijalnih probiotičkih sojeva, kao i za ispitivanjem funkcionalnih osobina molekula koji doprinose ispunjavanju zadatih kriterijuma u uslovima u kojima probiotici treba da ostvare svoju aktivnost.

U literaturi postoji sve veći broj podataka koji ukazuju da agregacioni faktori ekspimirani na površini ćelija laktobacila mogu biti odgovorni za neke probiotičke karakteristike, s obzirom da imaju bitnu ulogu u međubakterijskoj interakciji, kao i u interakciji sa epitelijalnim ćelijama GI trakta.

Zbog svega navedenog, cilj ovog rada bio je:

1. Odabir sojeva roda *Lactobacillus* iz kolekcije mikroorganizama Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju (LMM), koji ispoljavaju agregacioni fenotip u tečnoj kulturi.
2. Molekularna karakterizacija agregacionih faktora koje ekspimiraju odabrani sojevi roda *Lactobacillus*:
  - Lokalizacija gena koji kodira(ju) za faktore autoagregacije odabranih sojeva roda *Lactobacillus*;
  - Kloniranje gena koji kodira agregacioni faktor laktobacila i njegova ekspresija u homologom i heterologom domaćinu;
  - Analiza domenske organizacije agregacionog faktora laktobacila (AggLb); genetičke manipulacije konstrukcije varijanti AggLb agregacionog faktora i njihova ekspresija u homologom i heterologom domaćinu.

3. Funkcionalna analiza AggLb agregacionog faktora laktobacila eksprimiranog u homologom i heterologom domaćinu:

- Utvrđivanje značaja prisustva AggLb agregacionog faktora laktobacila:
  - u autoagregaciji bakterija;
  - u adheziji za epitelijalne ćelije intestinalne mukoze posredstvom mehanizma interakcije sa komponentama ECM-a;
  - u njegovom doprinosu kompeticiji probiotika za mesta vezivanja u GI traktu, u cilju sprečavanja adhezije i aktivacije patogena.
- Utvrđivanje doprinosa varijanti AggLb agregacionog faktora u ispoljavanju probiotičkih svojstava.

### **3. MATERIJAL I METODE**

## 3. MATERIJAL I METODE

## 3.1. Bakterijski sojevi i derivati

Bakterijski sojevi i derivati korišćeni u ovom radu su prikazani u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Korišćeni bakterijski sojevi i derivati.

Sojevi/derivati	Karakteristike sojeva/derivata	Izvor soja/derivata ili referenca
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>		
BGSJ2-8	Agg <sup>+</sup> , Prt <sup>+</sup> , Bac <sup>+</sup>	Lozo <i>et al.</i> , 2007
BGSJ2-81	Agg <sup>-</sup> , Prt <sup>+</sup> , Bac <sup>+</sup>	Lozo <i>et al.</i> , 2007
BGNJ1-64	Agg <sup>+</sup> Bac <sup>+</sup>	Ovo istraživanje
BGNJ1-641	Agg <sup>-</sup>	Ovo istraživanje
<i>Lactobacillus paracasei</i>		
BGAR75	Agg <sup>+</sup> , Prt <sup>+</sup> , Bac <sup>+</sup>	Nikolic <i>et al.</i> , 2010
BGGR2-68	Agg <sup>+</sup>	Nikolic <i>et al.</i> , 2010
BGGR2-82	Agg <sup>+</sup>	Nikolic <i>et al.</i> , 2010
BGZLS30-6	Agg <sup>+</sup>	Veljovic <i>et al.</i> , 2007
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>		
BGDP1-84	Agg <sup>+</sup>	Nikolic <i>et al.</i> , 2010
BGDP9-38	Agg <sup>+</sup> , Prt <sup>+</sup>	Ovo istraživanje
BGNJ1-3	Agg <sup>+</sup> , Prt <sup>+</sup>	Nikolic <i>et al.</i> , 2010
BGNJ1-61	Agg <sup>+</sup> , Prt <sup>+</sup> , Bac <sup>+</sup>	Nikolic <i>et al.</i> , 2010
BGNJ1-70	Agg <sup>+</sup> , Bac <sup>+</sup>	Nikolic <i>et al.</i> , 2010
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		
BGKP1	Agg <sup>+</sup>	Kojic <i>et al.</i> , 2011
BGKP1-20	Agg <sup>-</sup>	Kojic <i>et al.</i> , 2011
BGKP1-20/pALb35	Agg <sup>+</sup> , Em <sup>f</sup>	Ovo istraživanje
BGKP1-20/pAZIL-pPIAggLb	derivat BGKP1-20 koji nosi pAZIL-pPIAggLb	Ovo istraživanje
BGKP1-20/pAZIL-pPI4E	derivat BGKP1-20 koji nosi pAZIL-pPI4E	Ovo istraživanje
BGKP1-20/pAZIL-pPI3C	derivat BGKP1-20 koji nosi pAZIL-pPI3C	Ovo istraživanje
BGKP1-20/pAZIL-pPI3D	derivat BGKP1-20 koji nosi pAZIL-pPI3D	Ovo istraživanje
BGKP1-20/pAZIL-pPI3E	derivat BGKP1-20 koji nosi pAZIL-pPI3E	Ovo istraživanje
BGKP1-20/pAZIL-pPI2B	derivat BGKP1-20 koji nosi pAZIL-pPI2B	Ovo istraživanje
BGKP1-20/pAZIL-pPI2D	derivat BGKP1-20 koji nosi pAZIL-pPI2D	Ovo istraživanje
BGKP1-20/pAZIL-pPI2E	derivat BGKP1-20 koji nosi pAZIL-pPI2E	Ovo istraživanje
BGKP1-20/pAZIL-pPI1A	derivat BGKP1-20 koji nosi pAZIL-pPI1A	Ovo istraživanje
BGKP1-20/pAZIL-pPI1D	derivat BGKP1-20 koji nosi pAZIL-pPI1D	Ovo istraživanje
BGKP1-20/pAZIL-pPI1E	derivat BGKP1-20 koji nosi pAZIL-pPI1E	Ovo istraživanje
BGKP1-20/pAZIL-pKP-Lb	derivat BGKP1-20 koji nosi pAZIL-pKP-Lb	Ovo istraživanje
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>		
MG7284	Prt <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup>	Gasson, 1983
<i>Enterococcus faecalis</i>		
BGZLS10-27	Agg <sup>-</sup>	Valenzuela <i>et al.</i> , 2009

BGZLS10-27/pALb35	Agg <sup>+</sup> , Em <sup>r</sup>	Ovo istraživanje
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44, ΔlacU169 (Ø80lacZΔM15), hsdR17, recA1, andA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Hanahan, 1983
M15	F-, Ø80ΔlacM15, <i>thi, lac</i> -, <i>mtl</i> -, <i>recA</i> <sup>+</sup> , Km <sup>r</sup>	Qiagen
O157:H7		ATCC kolekcija
<i>Listeria innocua</i>		
ATCC33090		ATCC kolekcija
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1		Rathaningsih <i>et al.</i> , 1990
<i>Staphylococcus aureus</i>		
ATCC25923		ATCC kolekcija

Agg<sup>+</sup> - prisustvo autoagregacije; Agg<sup>-</sup> - odsustvo autoagregacije; Prt<sup>+</sup> - prisustvo proteinazne aktivnosti; Prt<sup>-</sup> - odsustvo proteinazne aktivnosti; Bac<sup>+</sup> - producent bakteriocina; Lac<sup>-</sup> - odsustvo sposobnosti fermentacije laktoze; Em<sup>r</sup> - rezistencija na eritromicin; Km<sup>r</sup> - rezistencija na kanamicin; ATCC - American type culture collection, Rockville, Md, SAD.

### 3.2. Korišćeni plazmidi

Plazmidi i konstrukti korišćeni u ovom radu su prikazani u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Korišćeni plazmidi i konstrukti.

Plazmidi i konstrukti	Karakteristike plazmida	Izvor plazmida ili referenca
pGEM-T Easy vektor	3015 bp, Amp <sup>r</sup> , vektor za kloniranje	Promega
pBlueScript vektor	2958 bp, Amp <sup>r</sup> , vektor za kloniranje	Agilent technologies
pCR2.1-TOPO vektor	3908 bp, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , vektor za kloniranje	Thermo Scientific
pCRII vektor	3971 bp, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , vektor za kloniranje	Thermo Scientific
pQE30 vektor	Amp <sup>r</sup> , ColE1 replikon, His <sub>6</sub> vektor za ekspresiju	Qiagen
pAZIL vektor	Em <sup>f</sup> , „shuttle“ vektor za kloniranje	Kojic <i>et al.</i> , 2011
pAZILSJ vektor	8589 bp, derivat pAZIL vektora koji nosi mesto otpočinjanja replikacije i repB gen iz plazmida pSJ2-8	Tolinački, 2012
pNJ1	~40 kb, plasmid soja BGNJ1-64 koji nosi <i>aggLb</i> gen	Ovo istraživanje
pALb35	11377 bp <i>SacI</i> fragment iz plazmida pNJ1 kloniran u pAZILSJ vektor	Ovo istraživanje
pAggLbSac-Sal	pALb35 bez <i>SalI</i> fragmenta veličine 484 bp na 3'-OH kraju, kao i bez <i>SacI-SacI</i> fragmenta na suprotnom kraju, dajući <i>SacI-SalI</i> fragment veličine 10094 bp u pAZIL-SJ vektor	Ovo istraživanje
SH4	<i>HindIII</i> fragment u okviru jednog od <i>SphI</i> fragmenta (> 5 kb) unutar konstrukta pALb35 kloniran u pBlueScript vektor	Ovo istraživanje
2Hind	<i>HindIII</i> fragment u okviru jednog od <i>SphI</i> fragmenta (> 5 kb) unutar konstrukta pALb35 kloniran u pBlueScript vektor	Ovo istraživanje
18Hind	<i>HindIII</i> fragment u okviru jednog od <i>SphI</i> fragmenta (> 5 kb) unutar konstrukta pALb35 kloniran u pBlueScript vektor	Ovo istraživanje
23Hind	<i>HindIII</i> fragment u okviru jednog od <i>SphI</i> fragmenta (> 5 kb) unutar konstrukta pALb35 kloniran u pBlueScript vektor	Ovo istraživanje
34Hind	<i>HindIII</i> fragment u okviru jednog od <i>SphI</i> fragmenta (> 5 kb) unutar konstrukta pALb35 kloniran u pBlueScript vektor	Ovo istraživanje
Exo2-2	pAggLbSac-Sal sečen <i>SacI-EcoRV</i> restrikcijom enzimima i tretiran ExoIII enzimom; veličina delecije 1904 bp, kraj delecije na poziciji 6723.	Ovo istraživanje
Exo12-4	pAggLbSac-Sal sečen <i>SacI-EcoRV</i> restrikcijom enzimima i tretiran ExoIII enzimom; veličina delecije 4315 bp, kraj delecije na poziciji 9134.	Ovo istraživanje
Exo17-1	pAggLbSac-Sal sečen <i>SacI-EcoRV</i> restrikcijom enzimima i tretiran ExoIII enzimom; veličina delecije 2119 bp, kraj delecije na poziciji 6938.	Ovo istraživanje
Exo19-4	pAggLbSac-Sal sečen <i>SacI-EcoRV</i> restrikcijom enzimima i tretiran ExoIII enzimom; veličina delecije 4631 bp, kraj delecije na poziciji 9450.	Ovo istraživanje

Exo25-5	pAggLbSac-Sal sečen <i>SacI-EcoRV</i> restrikcionim enzimima i tretiran ExoIII enzimom; veličina delecije 3449 bp, kraj delecije na poziciji 8268.	Ovo istraživanje
5HincII	<i>HincII</i> fragment iz pALb35 kloniran u pBlueScript vektor	Ovo istraživanje
3SspI	<i>SspI</i> fragment iz pALb35 kloniran u pBlueScript vektor	Ovo istraživanje
pAggLbXS	<i>XbaI-SalI</i> fragment iz pALb35 kloniran u pAZIL vektor	Ovo istraživanje
pBS-XP	prvi deo <i>aggLb</i> kloniran kao <i>XbaI-PstI</i> u pBlueScript vektoru	Ovo istraživanje
pCR-XP	prvi deo <i>aggLb</i> kloniran kao <i>XbaI-PstI</i> u pCR2.1-TOPO vektoru	Ovo istraživanje
pBS-PS	drugi deo <i>aggLb</i> kloniran kao <i>PstI-SalI</i> u pBlueScript vektoru	Ovo istraživanje
pBS-XP-1	pBS-PS parcijalno sečen sa <i>HindIII</i> restrikcionim enzimom i ligiran (bez 1461, 820 i 821 bp)	Ovo istraživanje
pCR-XP-2	pCR-XP parcijalno sečen sa <i>SspI</i> restrikcionim enzimom i ligiran (bez 630 i 1611 bp)	Ovo istraživanje
pCR-XP-3	pCR-XP parcijalno sečen sa <i>SspI</i> restrikcionim enzimom i ligiran (bez 1611 bp)	Ovo istraživanje
pBS-XP-4	isto kao pBS-XP (prvi deo <i>aggLb</i> kloniran kao <i>XbaI-PstI</i> u pBlueScript vektoru)	Ovo istraživanje
pBS-PS-A	isto kao pBS-PS (drugi deo <i>aggLb</i> kloniran kao <i>PstI-SalI</i> u pBlueScript vektoru)	Ovo istraživanje
pBS-PS-B	pBS-PS parcijalno sečen sa <i>HindIII</i> restrikcionim enzimom i ligiran (bez oba fragmenta od 1410 bp)	Ovo istraživanje
pBS-PS-C	pBS-PS parcijalno sečen sa <i>HindIII</i> restrikcionim enzimom i ligiran (bez 846 i bez oba fragmenta od 1410 bp)	Ovo istraživanje
pBS-PS-D	pBS-PS parcijalno sečen sa <i>HindIII</i> restrikcionim enzimom i ligiran (bez oba fragmenta od 1410 i 1266 bp)	Ovo istraživanje
pBS-PS-E	pBS-PS parcijalno sečen sa <i>HindIII</i> restrikcionim enzimom i ligiran (bez 846, bez oba fragmenta od 1410 i 1266bp)	Ovo istraživanje
pBS-PI4E	<i>XbaI/PstI</i> fragment iz pBS-XP-4 spojen sa <i>PstI-SalI</i> fragmentom iz pBS-PS-E, koristeći pBlueScript vektor	Ovo istraživanje
pBS-PI3C	<i>XbaI/PstI</i> fragment iz pCR-XP-3 spojen sa <i>PstI-SalI</i> fragmentom iz pBS-PS-C, koristeći pBlueScript vektor	Ovo istraživanje
pBS-PI3D	<i>XbaI/PstI</i> fragment iz pCR-XP-3 spojen sa <i>PstI-SalI</i> fragmentom iz pBS-PS-D, koristeći pBlueScript vektor	Ovo istraživanje
pBS-PI3E	<i>XbaI/PstI</i> fragment iz pCR-XP-3 spojen sa <i>PstI-SalI</i> fragmentom iz pBS-PS-E, koristeći pBlueScript vektor	Ovo istraživanje
pBS-PI2B	<i>XbaI/PstI</i> fragment iz pCR-XP-2 spojen sa <i>PstI-SalI</i> fragmentom iz pBS-PS-B, koristeći pBlueScript vektor	Ovo istraživanje
pBS-PI2D	<i>XbaI/PstI</i> fragment iz pCR-XP-2 spojen sa <i>PstI-SalI</i> fragmentom iz pBS-PS-D, koristeći pBlueScript vektor	Ovo istraživanje
pBS-PI2E	<i>XbaI/PstI</i> fragment iz pCR-XP-2 spojen sa <i>PstI-SalI</i> fragmentom iz pBS-PS-E, koristeći pBlueScript vektor	Ovo istraživanje
pBS-PI1A	<i>XbaI/PstI</i> fragment iz pBS-XP-1 spojen sa <i>PstI-SalI</i> fragmentom iz pBS-PS-A, koristeći pBlueScript vektor	Ovo istraživanje
pBS-PI1D	<i>XbaI/PstI</i> fragment iz pBS-XP-1 spojen sa <i>PstI-SalI</i> fragmentom iz pBS-PS-D, koristeći pBlueScript vektor	Ovo istraživanje



pBS-PI1E	<i>XbaI/PstI</i> fragment iz pBS-XP-1 spojen sa <i>PstI-SalI</i> fragmentom iz pBS-PS-E, koristeći pBlueScript vektor	Ovo istraživanje
pAZIL-pSE	laktokokalni promotor PlsB kloniran u pAZIL vektor zajedno sa <i>SacI-EagI</i> lider sekvencom iz <i>aggLb</i> gena	Ovo istraživanje
pAZIL-pPIAggLb	<i>EagI-SalI</i> fragment kloniran iz pALb35 u pAZIL-pSE konstrukt	Ovo istraživanje
pAZIL-pPI4E	<i>EagI-SalI</i> fragment kloniran iz pBS-PI4E u pAZIL-pSE konstrukt	Ovo istraživanje
pAZIL-pPI3C	<i>EagI-SalI</i> fragment kloniran iz pBS-PI3C u pAZIL-pSE konstrukt	Ovo istraživanje
pAZIL-pPI3D	<i>EagI-SalI</i> fragment kloniran iz pBS-PI3D u pAZIL-pSE konstrukt	Ovo istraživanje
pAZIL-pPI3E	<i>EagI-SalI</i> fragment kloniran iz pBS-PI3E u pAZIL-pSE konstrukt	Ovo istraživanje
pAZIL-pPI2B	<i>EagI-SalI</i> fragment kloniran iz pBS-PI2B u pAZIL-pSE konstrukt	Ovo istraživanje
pAZIL-pPI2D	<i>EagI-SalI</i> fragment kloniran iz pBS-PI2D u pAZIL-pSE konstrukt	Ovo istraživanje
pAZIL-pPI2E	<i>EagI-SalI</i> fragment kloniran iz pBS-PI2E u pAZIL-pSE konstrukt	Ovo istraživanje
pAZIL-pPI1A	<i>EagI-SalI</i> fragment kloniran iz pBS-PI1A u pAZIL-pSE konstrukt	Ovo istraživanje
pAZIL-pPI1D	<i>EagI-SalI</i> fragment kloniran iz pBS-PI1D u pAZIL-pSE konstrukt	Ovo istraživanje
pAZIL-pPI1E	<i>EagI-SalI</i> fragment kloniran iz pBS-PI1E u pAZIL-pSE konstrukt	Ovo istraživanje
pCRII-KPI	prvi deo KPPvScI kloniran kao PCR fragment u pCRII vektor	Ovo istraživanje
pAZIL-pKP-Lb	hibridni klon; sadrži prvi deo <i>aggL</i> gena kao <i>PvuI-PstI</i> fragment and drugi deo <i>aggLb</i> gena kao <i>PstI-SalI</i> fragment u pAZIL vektor	Ovo istraživanje
pQE <sub>30</sub> -AggBS	deo AggLb proteina fuzionisan sa His <sub>6</sub> -tagom u pQE <sub>30</sub> ekspresionom vektoru u cilju produkcije poliklonskog antitela AggLb-Ab	Ovo istraživanje

Amp<sup>r</sup>- rezistencija na ampicilin; Em<sup>r</sup>- rezistencija na eritromicin; Kan<sup>r</sup>- rezistencija na kanamicin.

### **3.3. Medijumi za optimalan rast i kultivacija bakterija**

Za rast laktobacila korišćen je MRS medijum (Merck, GmbH Darmštad, Nemačka) koji sadrži: bakto-proteazni pepton (10 g/l), mesni ekstrakt (8 g/l), ekstrakt kvasca (4 g/l), Tween 80 (1 g/l), amonijum-citrat (2 g/l), natrijum-acetat (5 g/l), magnezijum-sulfat (0,2 g/l), mangan-sulfat (0,04 g/l), natrijum-fosfat (2 g/l) i glukozu (20 g/l). Za rast laktokoka i enterokoka korišćen je GM17 medijum: M17 medijum (Merck, GmbH Darmštad, Nemačka) koji sadrži: polipepton (5 g/l), fitopepton (5 g/l), mesni ekstrakt (5 g/l), ekstrakt kvasca (2,5 g/l), L-askorbinsku kiselinu (0,5 g/l), magnezijum-sulfat (0,25 g/l), Na-β-glicerofosfat (19 g/l) i glukozu (5 g/l), pH 6,8. Derivati BMK koji su nosili plazmide gajeni su u MRS ili GM17 medijumu sa odgovarajućim antibiotikom (eritromicin 10 µg/ml). Čvrste podloge za rast bakterija pripremane su dodavanjem 1,5% agara u tečni medijum, pre sterilizacije u autoklavu u trajanju od 15 min na 121°C. BMK su gajene na optimalnoj temperaturi za rast (30°C).

Za rast bakterija *E. coli*, *S. aureus*, *L. innocua* i *P. aeruginosa* korišćen je Luria-Bertani (LB) tečni medijum koji sadrži: tripton (10 g/l), ekstrakt kvasca (5 g/l) i natrijum hlorid (5 g/l). Sojevi *E. coli* transformisani različitim vektorima gajeni su u LB medijumu sa odgovarajućim antibiotikom (ampicilin 100 µg/ml, eritromicin 300 µg/ml, kanamicin 100 µg/ml). Za selekciju kloniranih fragmenata (plavo-bela selekcija) u bakterijama *E. coli* korišćen je X-Gal (5-bromo-4-hloro-3-indolil-b-d-galaktopiranozid) u koncentraciji od 20 µg/ml. Čvrste podloge za rast bakterija pripremane su dodavanjem 1,5% agara u LB tečni medijum, pre sterilizacije u autoklavu u trajanju od 15 min na 121°C. Sojevi *S. aureus*, *L. innocua* su inkubirani na 37°C bez aeracije, dok su bakterije *E. coli* i *P. aeruginosa* kultivisane na 37°C uz aeraciju (180 rpm).

Sojevi i derivati BMK, kao i odabrani transformanti *E. coli* su čuvani u odgovarajućim medijumima za rast sa 15% glicerola na -80°C.

### **3.4. Metode rada sa bakterijama**

#### **3.4.1. Metode izolovanja i determinacije sojeva**

Odabrani sojevi roda *Lactobacillus* analizirani u ovom radu izolovani su iz fermentisanih mlečnih proizvoda proizvedenih u domaćinstvima, klasičnom mikrobiološkom izolacijom. U ranijim istraživanjima, primenom mikrobioloških i biohemijskih testova, determinisani su pomenuti sojevi laktobacila. Metodama molekularne determinacije je izvršena identifikacija većine korišćenih sojeva roda *Lactobacillus*, izuzev BGNJ1-64 i BGDP9-38 (Lozo *et al.*, 2007; Nikolić *et al.*, 2010). Stoga, je u ovom radu urađena determinacija sojeva BGNJ1-64 i BGDP9-38 (videti Materijal i metode, 3.5.2.4. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom).

#### **3.4.2. Čišćenje plazmida iz ćelija laktobacila**

Čišćenje plazmida iz sojeva laktobacila rađeno je istovremenom primenom povišene temperature (42°C) i subletalne koncentracije antibiotika novobiocina (koje su za odabrane sojeve eksperimentalno utvrđene), kako bi se obezbedila replikacija hromozomalne DNK i ćelijska deoba pre replikacije plazmida za koje pretpostavljamo da nose gen za sintezu agregacionog faktora. Prekonoćna kultura tretiranog soja je razblažena svežim medijumom za rast koji je sadržao subletalnu koncentraciju novobiocina (8 i 10 µg/ml) u zapreminskom odnosu tako da se postigne broj od 10<sup>3</sup> CFU/ml medijuma. Ćelije su inkubirane ukupno 12 sati na 42°C, a na svaka 2 sata im je menjan medijum za rast tako što su centrifugirane (4000 rpm, 15 min, sobna temperatura (Room Temperature, RT), klinička centrifuga 5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Talog bakterija je resuspendovan u istom volumenu svežeg medijuma koji je sadržao novobiocin (8 i 10 µg/ml). Nakon poslednjeg tretmana, alikvoti kulture (100 µl) su utrljavani na petri šolje i gajeni na optimalnoj temperaturi za rast soja (30°C). Dobijene kolonije testirane su određivanjem agreacionog fenotipa u tečnoj kulturi (ukoliko su ćelije grupisane na dnu epruvete - Agg<sup>+</sup> fenotip ili su homogeno raspoređene u epruveti - Agg<sup>-</sup> fenotip).

### **3.4.3. Transformacija *E. coli* ćelija**

#### **3.4.3.1. Priprema *E. coli* kompetentnih ćelija**

Priprema kompetentnih *E. coli* ćelija za transformaciju temperaturnim šokom, „Heat shock“, rađena je po modifikovanoj metodi sa rubidijum hloridom (Hanahan, 1985). LB medijum, 100 ml inokulisan je sa 1 ml kulture dobijene resuspendovanjem 10 kolonija sa sveže, prekonoćne, LA petri šolje i ćelije su gajene na 37°C uz intenzivnu aeraciju na 180 rpm u sudu koji je volumena 20 puta većeg od medijuma, do dostizanja srednje logaritamske faze rasta ( $OD_{600nm}=0,3-0,6$ ). Rast bakterijske kulture je zaustavljen inkubacijom kulture 15 min na ledu. Nakon inicijalnog hlađenja bakterije su obarane iz medijuma (3500 rpm, 10 min, 4°C, klinička centrifuga 5804R). Supernatant je odlivan, a talog resuspendovan laganim mešanjem u istom volumenu prethodno ohlađenog 0,1 M  $CaCl_2$  i inkubiran 15 min na ledu. Ćelije su zatim ponovo obarane (3500 rpm, 10 min, 4°C, klinička centrifuga 5804R), a talog resuspendovan u 1/12,5 volumena RF2 pufera (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM  $CaCl_2 \times 2H_2O$ , 15% glicerol, pH 6,8). Suspenzija ćelija je inkubirana na ledu 15 min, a zatim podeljena u alikvote od po 200  $\mu$ l, koji su naglo zamrzavani u tečnom azotu, a zatim čuvani na -80°C do korišćenja.

#### **3.4.3.2. Transformacija *E. coli* kompetentnih ćelija toplotnim šokom („Heat shock“)**

Predhodno pripremljene, pa zamrznute kompetentne ćelije *E. coli* prvo su otapane okretanjem mikrotuba među prstima, a zatim uranjane u led. Nakon otapanja u mikrotube sa po 200  $\mu$ l kompetentnih ćelija dodavano je do 200 ng plazmidne DNK ili prečišćene ligacione smeše (u zapremini do 20  $\mu$ l). Suspenzija je držana na ledu 60 min uz povremeno lagano mešanje. Nakon inkubacije ćelije su izlagane temperaturnom šoku (42°C) u trajanju od 90 sek, a zatim su inkubirane još 5 min na ledu. Posle tretmana u ćelijske suspenzije dodavano je 300  $\mu$ l LB medijuma za regeneraciju, smeša je zatim inkubirana 30 do 60 min zavisno od ekspresije antibiotske rezistencije na 37°C uz aeraciju. Alikvoti regenerisane transformacione smeše razmazivani su na odgovarajuće čvrste selektivne LB podloge (sa antibiotikom) koje su inkubirane na 37°C do pojave transformanata (prosečno 24 sata inkubacije).

### **3.4.4. Transformacija BMK**

#### **3.4.4.1. Transformacija laktobacila elektroporacijom**

Priprema laktobacilusnih elektrokompetentnih ćelija i elektroporacija rađena je prema već opisanoj metodi (Walker *et al.*, 1996). Pojedinačna kolonija sa MRS podloge zasejavana je u MRS medijum i gajena na 30°C preko noći. Zatim je prekonoćna kultura razblažena 100 puta u MRS-u sa 1% glicinom. Kultura je inkubirana na 30°C do  $OD_{600nm} = 0,2-0,6$ . Talog bakterija iz 50 ml kulture je ispiran dva puta u istoj zapremini HEB pufera (272 mM saharoza, 8 mM HEPES, pH 7,5) i resuspendovan u 200  $\mu$ l istog rastvora. Nakon dodavanja 1  $\mu$ g plazmidne DNK, smeša je držana 5 min na ledu, a zatim je suspenzija mešana i prebacivana u kivete za elektroporaciju (dijametra 0,2 cm). Elektropulsiranje bakterija je rađeno u GENE PULSER aparatu (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) sa podešenim uslovima od 6,25 kV/cm, 25  $\mu$ F i 200  $\Omega$ , gde su laktobacili podvrgnuti pulsu jačine 1,25 kV/cm. U kivetu sa suspenzijom pulsiranih ćelija odmah je dodavana smeša za regeneraciju (MRS, 20 mM saharoza, 10 mM  $MgCl_2$ ) koja je zatim inkubirana 5 min na ledu. Nakon toga smeša je inkubirana 3 h na 30°C, a zatim su alikvoti transformacione smeše razmazivani na MRS selektivne podloge sa odgovarajućim antibiotikom (eritromicin, 10  $\mu$ g/ml) koje su inkubirane na 30°C do pojave transformanata (najčešće 2-3 dana).

#### **3.4.4.2. Transformacija laktokoka i enterokoka elektroporacijom**

Priprema elektrokompetentnih ćelija laktokoka i enterokoka, kao i elektroporacija rađena je prema modifikovanoj metodi koju su opisali Holo i Nes (Holo and Nes, 1989). Pojedinačna kolonija sa GM17 podloge zasejavana je u GM17 medijum i gajena na 30°C preko noći. Prekonoćna kultura laktokoka ili enterokoka je razblažena 100 puta u GM17 medijumu sa 1% glicina. Kultura je inkubirana na 30°C do dostizanja log faze rasta,  $OD_{600} = 0,2-0,6$ . Talog bakterija iz 50 ml kulture je opran dva puta u istoj zapremini sterilne bidestilovane vode i finalno resuspendovan u 200  $\mu$ l vode. Nakon dodavanja 1  $\mu$ g plazmidne DNK, smeša je promešana i inkubirana 5 min na RT, a zatim prebačena u kivete za elektroporaciju (dijametra 0,2 cm). Elektropulsiranje bakterija je rađeno u GENE PULSER aparatu (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) pri otporu od 200  $\Omega$ , gde su laktokoke i enterokoke podvrgnute električnom pulsu jačine 2,45 kV/cm. U kivetu pulsiranih ćelija odmah je dodavan tečni GM17 medijum u cilju regeneracije transformisanih ćelija. Nakon toga smeša je inkubirana 2 h na 30°C, a zatim su alikvoti smeše utrljani na GM17 čvrste selektivne

podloge sa odgovarajućim antibiotikom (eritromicin, 10 µg/ml) koje su inkubirane na 30°C do pojave transformanata (24-48 h).

### **3.4.5. Metode analize agregacije i površinskih karakteristika odabranih laktobacila**

#### **3.4.5.1. Kinetika autoagregacije i koagregacije**

Prekonoćne bakterijske kulture su dva puta oprane u PBS puferu (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, pH 7,5) i resuspendovane u istom puferu tako da sadrže približno 10<sup>8</sup> CFU/ml. Za praćenje autoagregacije, merena je optička gustina suspenzije bakterijskih ćelija na 600 nm (4 ml) na spektrofotometru (Ultrospec 500 pro, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Engleska), tokom 5 h na svakih sat vremena i po potrebi nakon 24 h. Procenat autoagregacije je računat prema sledećoj formuli (Kos *et al.*, 2003):

$$1 - (A_t/A_0) \times 100\%$$

gde su:

A<sub>0</sub> - vrednost optičke gustine suspenzije na početku merenja;

A<sub>t</sub> - vrednost optičke gustine suspenzije nakon određenog vremenskog perioda.

Za praćenje koagregacije testiranih sojeva koji na površini eksprimiraju agregacioni faktor poreklom iz laktobacila i patogenih sojeva, ćelije su resuspendovane u PBS puferu do 10<sup>8</sup> CFU/ml i po 2 ml suspenzije obe vrste bakterija za koje se prati koagregacija su pomešane (ukupno 4 ml). Procenat koagregacije je računat prema sledećoj formuli (Janković *et al.*, 2012):

$$\frac{((A_{pat} + A_{lb})/2 - A_{mix})}{(A_{pat} + A_{lb})/2} \times 100\%$$

gde su:

A<sub>pat</sub> - vrednost optičke gustine patogenog soja za koji se prati koagregacija, bez sjedinjavanja sa sojevima koji na površini eksprimiraju agregacioni faktor poreklom iz laktobacila);

A<sub>lb</sub> - vrednost optičke gustine soja koji na površini eksprimira agregacioni faktor poreklom iz laktobacila za koji se prati koagregacija, bez sjedinjavanja sa patogenim sojem);

A<sub>mix</sub> - vrednost optičke gustine suspenzije sjedinjenih sojeva bakterija za koje se prati koagregacija nakon određenog vremenskog perioda.

Eksperimenti kinetike autoagregacije/koagregacije su ponovljeni tri puta koristeći tri nezavisne prekonoćne kulture za svaki testirani soj.

### **3.4.5.2. Određivanje prirode faktora koji učestvuju u agregaciji**

Da bi se odredila proteinska priroda molekula koji učestvuju u agregaciji, odabrani soj je tretiran proteinazom K (Merck, Darmstadt, Nemačka), a na osnovu metode koja je ranije opisana (Schachtsiek *et al.*, 2004). Oko 5 ml ( $10^8$  CFU/ml) bakterijske kulture soja koji se testira (BGNJ1-64) je dva puta oprano u PBS puferu, finalno resuspendovano u istom puferu sa proteinazom K (1 mg/ml) i inkubirano 1 h na 37°C. Tretirane ćelije su oborene (4500 rpm, 5 min, klinička centrifuga 5804R) i oprane dva puta u PBS puferu. Kontrolni uzorci bili su ćelije analiziranog soja resuspendovane u PBS puferu, ali netretirane proteinazom K, kao i ćelije derivata soja BGNJ1-64 koji ne agregira (BGNJ1-641). Sposobnost agregacije tretiranih/netretiranih ćelija je praćena na dva načina: (i) na osnovu agregacionog fenotipa u tečnoj kulturi (ukoliko su ćelije grupisane na dnu epruvete - Agg<sup>+</sup> fenotip ili su homogeno raspoređene u epruveti - Agg<sup>-</sup> fenotip); (ii) konfokalnom mikroskopijom pri čemu su bakterijske ćelije analiziranih sojeva laktobacila obojene DNK fluorescentnom heksidijum jodid bojom (HJ, ekscitacija/emisija na 480 nm/625 nm). U cilju pripreme preparata za konfokalnu mikroskopiju tretirane (Agg<sup>+</sup>)/netretirane (Agg<sup>+</sup>)/kontrolne (Agg<sup>-</sup>) ćelije (po 2 ml kulture) su oborene, oprane dva puta u PBS puferu i inkubirane sa 0,03 μmol HJ, 15 minuta na RT uz konstantno lagano mešanje u mraku. Višak boje je odstranjen tako što su obojene ćelije oborene (3000 rpm, 2 min, centrifuga 5415D, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i oprane tri puta PBS puferom (neohodno je obavezno isprati višak HJ boje), a potom su nanete na dno staklene posude, prekrivene pokrovnim staklom i analizirane konfokalnom mikroskopijom pomoću Leica SP8 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Nemačka). Dobijene slike su obrađene koristeći Leica LAS AF softver.

### **3.4.5.3. Analiza površinskih karakteristika laktobacila - adhezija za organske rastvarače**

Adhezija za heksadekan, hloroform i etil-acetat rađena je po već opisanom protoklu (Pelletier *et al.*, 1997). Prekonoćne kulture testiranih sojeva su oborene u centrifugi (4500 rpm, 10 min, klinička centrifuga 5804R), oprane dva puta u 0,1 M KNO<sub>3</sub> (pH 6,2) i resuspendovane do optičke gustine 0,4 na 400 nm u istom puferu. Heksadekan je korišćen kao nepolarni rastvarač i adhezija bakterijskih ćelija za ovaj rastvarač može da posluži kao

merilo hidrofobnosti površine bakterija, hloroform je korišćen kao monopolarni, kiseli rastvarač i etil acetat kao monolpolarni bazni rastvarač. Pomešano je 1,2 ml suspenzije bakterijskih ćelija sa 0,2 ml heksadekana, hloroforma ili etil-acetata (nezavisno) u epruvetama, a potom su smeše inkubirane 10 min na RT. Nakon toga su suspenzije vorteksovane 2 min posle čega su inkubirane na RT da bi se potpuno razdvojile faze (30 min). Nakon toga, merena je optička gustina donje faze (koja je prethodno pažljivo prebačena u kivete) na 400 nm. Procenat adhezije za organske rastvarače je računat prema formuli:

$$(1 - A_1/A_0) \times 100\%$$

gde su:

$A_0$  - vrednost optičke gustine suspenzije na početku merenja;

$A_1$  - vrednost optičke gustine donje faze suspenzije nakon određenog vremenskog perioda.

Eksperiment je ponovljen tri puta korišćenjem tri nezavisne prekonocne kulture za svaki testirani soj.

#### 3.4.5.4. Analiza vezivanja za imobilisani kolagen

Bunarići Maxisorb ploče sa ravnim dnom (Nunc, Roskilde, Danska) obloženi su sa 200  $\mu$ l kolagena tipa I [(iz repa pacova) (BD Bioscience, Nju Džerzi, SAD) rastvorenog u 0,1 M sirćetnoj kiselini u koncentraciji 100  $\mu$ g/ml], inkubacijom na 4°C u trajanju od 16 h. Ista zapremina PBS pufera dodavana je u kontrolne bunariće (neobložene kolagenom). Iz neobloženih bunarića i bunarića obloženih kolagenom izvučen je sadržaj, a zatim su oprani dva puta PBS puferom nakon čega je dodato 200  $\mu$ l 2% BSA rastvorenog u PBS puferu. Nakon inkubacije u trajanju od 1 h na RT uz lagano mešenje (~ 80 rpm), bunarići su oprani PBS puferom i dodato je po 100  $\mu$ l testiranih bakterijskih suspenzija ( $10^8$  CFU/ml) prethodno opranih i resuspendovanih u PBS puferu. Svaki derivat je testiran u triplikatu, uključujući neobložene (kontrolne) bunariće i one obložene kolagenom. Nakon inkubacije u trajanju od 2 h na 37°C, bunarići su lagano oprani tri puta PBS puferom. Fiksiranje vezanih bakterija postignuto je sušenjem ploče 45 min na 65°C. U sledećem koraku u bunariće je dodato po 200  $\mu$ l kristal violeta (HIMedia, Kikinda) u koncentraciji od 0,1 mg/ml i inkubirano u trajanju 45 minuta na RT. Nevezana boja uklonjena je pranjem bunarića tri puta PBS puferom, nakon čega je dodat 50 mM citratni pufer, pH 4,0. Ploče su inkubirane 1 h na RT kako bi se rastvorila boja



vezana za bakterijske ćelije. Intenzitet vezivanja derivata za površinu bunarića određen je merenjem apsorbance na 570 nm pomoću uređaja Labsystems Multiscan RC plate reader (MTX Lab Systems, Beč, Austrija).

Paralelno sa prethodno opisanim eksperimentom, u cilju testiranja specifičnosti vezivanja analiziranih sojeva za imobilisani kolagen, rađen je eksperiment inhibicije vezivanja bakterija za kolagen. Bakterijske suspenzije ( $10^8$  CFU/ml) prethodno oprane i resuspendovane u PBS puferu, pre dodavanja u obložene i pripremljene bunariće sa kolagenom, inkubirane su sa heparinom (natrijumova so) izolovanim iz mukoze svinjskog intestinuma (Sigma, Nemačka) u finalnoj koncentraciji 1mg/ml u trajanju od 1 h na 30°C.

### **3.4.5.5. Analiza vezivanja za imobilisani fibronektin**

Bunarići Maxisorb ploče sa ravnim dnom (Nunc, Roskilde, Danska) obloženi su sa 200 µl fibronektina [(humanog porekla) (Serva, Hajdelberg, Nemačka) rastvorenog u PBS puferu u koncentraciji 100 µg/ml], inkubacijom na 4°C u trajanju od 16 h (Ahmed *et al.*, 2001). Dalji tok eksperimentalnog protokola je identičan kao što je opisan u prethodnom poglavlju 3.4.5.4. Analiza vezivanja za imobilisani kolagen.

### **3.4.5.6. Analiza sposobnosti formiranja biofilma**

Analiza sposobnosti formiranja biofilma rađena je po već opisanoj metodi uz minimalne modifikacije (Peter *et al.*, 2013). Bunarići Maxisorb ploče sa ravnim dnom (Nunc, Roskilde, Danska) obloženi su sa po 100 µl testiranih bakterijskih suspenzija ( $10^8$  CFU/ml) prethodno opranih i resuspendovanih u PBS puferu. Svaki derivat je testiran u triplikatu, uključujući odgovarajuće kontrolne bunariće: (i) bunarići tretirani samo PBS puferom, bez dodavanja bakterijskih suspenzija; (ii) negativna kontrola (*E. coli* DH5α); (iii) pozitivna kontrola (*P. aeruginosa* PAO1). Nakon inkubacije u trajanju 2 h na 37°C, bunarići su pažljivo oprani tri puta PBS puferom. Fiksiranje vezanih bakterija postignuto je sušenjem ploče 45 min na 65°C. U sledećem koraku u bunariće je dodato po 200 µl kristal violeta (HIMedia, Kikinda) u koncentraciji od 0,1 mg/ml i inkubirano sa vezanim ćelijama u trajanju od 45 minuta na RT. Nevezana boja uklonjena je pranjem tri puta u PBS puferu, nakon čega je dodato po 200 µl smeše etanol - aceton (80:20). Ploče su inkubirane 1 h na RT kako bi se rastvorila boja vezana za bakterije. Intenzitet vezivanja derivata za površinu bunarića određen

je merenjem apsorbance na 570 nm pomoću uređaja Labsystems Multiscan RC plate reader.

#### **3.4.5.7. Analiza sposobnosti odabranih sojeva laktobacila u ekskluziji patogena**

Bunarići Maxisorb ploče sa ravnim dnom (Nunc, Roskilde, Danska) obloženi su sa 200 µl kolagena tipa I [(iz repa pacova) (BD Bioscience, Nju Džerzi, SAD) rastvorenog u 0,1 M sirćetnoj kiselini u koncentraciji 100 µg/ml], inkubacijom na 4°C u trajanju od 16 h. Ista zapremina PBS pufera dodata je u neobložene bunariće kolagenom (kontrola). Neobloženi bunarići i bunarići obloženi kolagenom oprani su dva puta u PBS puferu nakon čega je dodato 200 µl 2% BSA rastvorenog u PBS puferu. Nakon inkubacije u trajanju od 1 h na RT uz lagano mešenje (~ 80 rpm), bunarići su oprani PBS puferom i dodato je po 100 µl testiranih bakterijskih suspenzija ( $10^8$  CFU/ml) prethodno opranih i resuspendovanih u PBS puferu. Svaki derivat je testiran u triplikatu, uključujući neobložene (kontrolne) bunariće i one obložene kolagenom. Nakon inkubacije u trajanju od 3 h na 37°C, bunarići su lagano oprani dva puta PBS puferom, a potom su dodati testirani patogeni sojevi: *S. aureus* ATCC25923 i *E. coli* O157:H7 (po 100 µl) i nastavljeno je inkubiranje ploča u trajanju od 3 h na 37°C. Bunarići su lagano oprani dva puta PBS puferom u cilju ispiranja nevezanih bakterija. Fiksiranje vezanih bakterija postignuto je sušenjem ploče 45 min na 65°C. Potom je u bunariće dodato po 100 µl 0,1% Triton X-100 i ploče su inkubirane u trajanju od 30 min na RT. U narednom koraku, uzimani su uzorci (100 µl) za izračunavanje CFU/ml broja bakterija, pošto su napravljena razblaženja u Ringerovom rastvoru. Alikvoti iz svakog razblaženja (10 µl) su u triplikatu naneti na odgovarajuće čvrste podloge. Inhibicija adhezije prikazana je kao razlika između adhezije patogenih sojeva u odsustvu i prisustvu testiranih sojeva laktobacila.

### **3.5. Metode rada sa DNK**

#### **3.5.1. Metode izolacije DNK iz bakterija**

##### **3.5.1.1. Metoda za brzo izolovanje ukupne DNK iz laktobacila**

Ukupna DNK iz laktobacila je izolovana po modifikovanoj metodi koju su opisali Hopwood i saradnici (Hopwood *et al.*, 1985). Talog dobijen centrifugiranjem bakterija iz 10 ml logaritamske kulture je opran u TEN puferu (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8,0), a zatim resuspendovan u 0,5 ml PP pufera (0,5 M saharoza, 40 mM NH<sub>4</sub>-

acetat, 10 mM Mg-acetat, pH 7,0) sa lizozimom u finalnoj koncentraciji 7 mg/ml. Smeša je inkubirana na 37°C u trajanju od 30 min dok ćelije nisu postale translucetne, nakon čega je dodavano 250 µl 2% SDS-a i suspenzija intenzivno izmešana na vorteksu u trajanju od 1 min ili dok viskozitet nije postao primetno manji. Posle ovog koraka vršeno je odstranjivanje proteina višestrukom fenolskom ekstrakcijom pri čemu je svaki put dodavano 250 µl neutralnog fenol-hloroforma, rastvor intenzivno mešan u trajanju od 30 sec i centrifugiran (13000 rpm, 2 min, RT, centrifuga 5415D). Dobijeni supernatant je prebačen u nove mikrotube u koje je dodavana 1/10 volumena 3 M Na-acetata i 1 volumen izopropanola. Ukupna DNK je taložena centrifugiranjem (13000 rpm, 10 min, RT, centrifuga 5415D). Talog totalne DNK je ispiran od viška soli dodavanjem hladnog etanola (75%, - 20°C), centrifugiran (13000 rpm, 2 min, RT, centrifuga 5415D), sušen i resuspendovan u 50 µl bidestilovane vode. RNK je odstranjivana inkubacijom uzorka sa 1 µl RNA-ze (10 mg/ml) na 37°C u trajanju od 30 min. Ovako izolovana DNK je stabilna i pogodna za digestiju restrikcionim enzimima, a čuvana je na temperaturi od -20 °C.

### **3.5.1.2. Metoda za izolovanje velikih količina plazmidne DNK iz laktobacila**

Plazmidna DNK iz laktobacila izolovana je prema metodi koju su opisali Anderson i McKay (1983). Za pranje taloga bakterijskih ćelija (dobijenog centrifugiranjem bakterija iz 500 ml logaritamske faze kulture ( $OD_{600nm}=0,6-0,8$ ) korišćeno je 5 ml TEN pufera. Talog je zatim resuspendovan u 12,5 ml STE pufera (6,7% saharoza, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) i inkubiran na 37°C. Dodavan je lizozim u finalnoj koncentraciji od 7 mg/ml i suspenzija je inkubirana 10 min na 37°C. Zatim je dodavano 3,15 ml rastvora 0,25 M EDTA i 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, a potom i 0,9 ml 20% SDS. Nakon toga vršeno je intenzivno mešanje na vorteksu dok viskozitet rastvora nije postao primetno manji (prosečno u trajanju od 1 min). Posle ovog koraka smeša je inkubirana 10 min na 37°C, a nakon toga je dodavan 1 ml 3 M NaOH. Posle blagog mešanja u lizat je dodavan i 1,65 ml 2 M Tris-HCl, pH 7,0. Kada je smeša dobro izmešana dodavano je 2,4 ml 5M NaCl i centrifugirana (10000 rpm, 30 min, 4°C, centrifuga Sorvall RC-5B, SS34 rotor). Dobijeni supernatant je pažljivo prebačen u čiste konusne (Falkon) epruvete, dodavana je jedna zapremina fenol-hloroforma, intenzivno mešana, a zatim je centrifugirana (5000 rpm, 15 min, 4°C, klinička centrifuga 5804R). Dobijeni supernatant je prebačen u čiste epruvete i plazmidna DNK je precipitirana dodavanjem 1 volumena izopropanola preko noći na 4°C. Nakon centrifugiranja (5000 rpm, 20 min, 4°C, klinička centrifuga 5804R) talog je ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C),

osušen i resuspendovan u bidestilovanoj vodi. RNK je odstranjivana inkubacijom uzorka sa 1  $\mu$ l RNaze (10 mg/ml) na 37°C u trajanju od 30 min.

#### **3.5.1.2.1. Prečišćavanje plazmidne DNK u gradijentu CsCl**

Na mililitar rastvora DNK, dobijenog u procesu izolacije (Anderson i McKay, 1983), dodavan je 1 g čvrstog CsCl i rastvor etidijum bromida (0,04 ml, koncentracije 10 mg/ml). Ovaj rastvor je prenošen u epruvete za Beckman Ti50 rotor. Izopikničko razdvajanje plazmidne i hromozomalne DNK ostvareno je centrifugiranjem (45000 rpm, 48 h, 4°C, Beckman ultracentrifuga. rotor Ti50). Pod UV svetlom su se nakon centrifugiranja mogle videti dve fluorescirajuće trake: gornja, koja sadrži hromozomalnu DNK i donja, u kojoj se nalazi kovalentno zatvorena, cirkularna forma plazmidne DNK. Željene trake hromozomalne i plazmidne DNK su vađene iz epruveta tako što je zid epruvete probušen nešto ispod nivoa trake, sadržaj trake je izvlačen špricom (sa iglom) i prebacivan u čiste mikrotube. Iz ovako dobijenog rastvora DNK etidijum bromid je ekstrahovan korišćenjem izoamil alkohola (u odnosu zapremina 1:1), a CsCl dijaliziranjem u 3 puta većoj zapremini bidestilovane vode.

#### **3.5.1.3. Mini metod za izolovanje velikih plazmida iz laktobacila**

Autohtoni plazmidi iz laktobacila su izolovani po prethodno opisanoj proceduri (O'Sullivan and Klaenhammer, 1993). Za pranje taloga bakterijskih ćelija (dobijenog centrifugiranjem bakterija iz 10 ml logaritamske faze kulture ( $OD_{600nm}=0,6-0,8$ ) korišćeno je 500  $\mu$ l TEN pufera. Talog je nakon pranja resuspendovan u 200  $\mu$ l 25% saharoze sa lizozimom u finalnoj koncentraciji od 30 mg/ml. Tako dobijena ćelijska suspenzija je inkubirana 1 sat na 37°C, zatim je u nju dodavano 400  $\mu$ l sveže napravljenig alkalnog rastvora SDS-a (3% SDS, 0,2 M NaOH), nakon čega je sledila inkubacija 7 min na RT. Posle dodavanja 300  $\mu$ l 3 M Na-acetata, pH 4,8, ohlađenog na ledu, uzorci su ohlađeni 10 min na -20°C, a zatim centrifugirani (13000 rpm, 20 min, RT, centrifuga 5415D). Supernatant je prebacivan u nove mikrotube uz dodavanje 650  $\mu$ l izopropanola, a zatim centrifugiran (13000 rpm, 15 min, RT, centrifuga 5415D). Dobijeni talog je nakon sušenja resuspendovan u 320  $\mu$ l vode i smeši je dodavano 200  $\mu$ l 7,5 M  $NH_4$ -acetata koji sadrži 0,5 mg/ml etidijum bromida, a zatim i 350  $\mu$ l smeše fenol-hloroforma. Ovako dobijena smeša je dobro promešana na vorteksu i centrifugirana (13000 rpm, 10 min, RT, centrifuga 5415D). Gornja (vodena) faza je prebacivana u nove mikrotube, a DNK iz rastvora je precipitirana dodavanjem 2 volumena hladnog etanola (96%, -20°C) i centrifugiranjem (13000 rpm, 20 min, RT, centrifuga 5415D).

Uzorak je zatim ispiran hladnim etanolom (75%, -20°C), centrifugiran (13000 rpm, 5 min, RT, centrifuga 5415D), a talog je nakon odstranjivanja etanola sušen i resuspendovan u 20 µl bidestilovane vode. RNK je odstranjivana inkubacijom uzorka sa 1 µl RNaze (10 mg/ml) na 37°C u trajanju od 30 min. Pre provere na gelu, uzorci izolovane plazmidne DNK su čuvani na -20°C.

### **3.5.1.4. Mini metod za izolovanje plazmidne DNK iz *E. coli***

Izolacija plazmidne DNK iz *E. coli* rađena je po modifikovanoj metodi „JETSTAR Plasmid Kit-MINI“ (Genomed, GmbH, Austrija). Talog ćelija (3 ml) iz logaritamske kulture bakterija ( $OD_{600}=0,6-0,8$ ) je opran u TEN puferu i resuspendovan u 200 µl E1 rastvora (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8,0) sa RNA-zom (finalne koncentracije 100 µg/ml). Zatim je rađena ćelijska liza (odmah nakon resuspendovanja u E1) dodavanjem 200 µl rastvora E2 (200 mM NaOH, 1% SDS), uz lagano mešanje do homogenizacije lizata (nekoliko puta blago okrenuti mikrotube). Nakon homogenizacije rađena je neutralizacija dodavanjem 200 µl rastvora E3 (3,1 M K-acetat, pH 5,5) uz intenzivno mešanje. Smeša je zatim centrifugirana (13000 rpm, 10 min, RT, centrifuga 5415D). Dobijeni supernatant je prebacivan u nove mikrotube, dodavano je 200 µl smeše fenol-hloroforma uz intenzivno mešanje u trajanju od 1 min (ovaj korak podrazumeva se jedino u slučaju izolacije plazmida iz M15 ćelija, ne i u slučaju izolacije plazmida iz DH5α). Posle centrifugiranja (13000 rpm, 2 min, RT, centrifuga 54125D) gornja (vodena) faza je prebacivana u nove mikrotube, a DNK iz rastvora je precipitirana dodavanjem jednog volumena izopropanola i centrifugiranjem (13000 rpm, 20 min, RT, centrifuga 54125D). Uzorak je zatim ispiran hladnim etanolom (75%, - 20°C) i centrifugiran (13000 rpm, 5 min, RT, centrifuga 54125D), a talog je nakon odstranjivanja etanola sušen i resuspendovan u 20 µl bidestilovane H<sub>2</sub>O. RNK je odstranjivana inkubacijom uzorka sa 1 µl RNaze (10 mg/ml) na 37°C u trajanju od 30 min. Uzorci plazmidne DNK su čuvani na -20°C.

### **3.5.1.5. Mini metod za izolovanje plazmidne DNK iz *E. coli* za potrebe sekvenciranja i kloniranja**

Plazmidne DNK iz *E. coli* za potrebe sekvenciranja i kloniranja izolovana je korišćenjem kita „QIAGEN Plasmid Mini-Prep Kit“ (Qiagen, Nemačka) po uputstvu proizvođača.

### **3.5.2. Enzimske reakcije sa DNK**

#### **3.5.2.1. Sečenje DNK restrikcionim enzimima**

Sečenje restrikcionim enzimima je rađeno u komercijalno proizvedenim puferima preporučenim za svaki restrikcioni enzim. Uslovi za sečenje DNK restrikcionim enzimima kao što su količina enzima i temperatura inkubacije, primenjivani su prema uputstvu proizvođača (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija).

#### **3.5.2.2. Defosforilacija 5' slobodnih krajeva DNK fragmenata**

Defosforilacija 5' slobodnih krajeva DNK fragmenata vršena je sa „Antarctic phosphatase“ (New England BioLabs, MA, SAD) po uputstvu proizvođača: DNK (1-20 ng) rastvorena u 1 × reakcionom puferu (50 mM Bis Tris-propan, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>, pH 6,0) inkubirana je sa 0,1 U enzima, 15 ili 60 min na 37°C u zavisnosti od krajeva koje ostavljaju restrikcioni enzimi (ravni, 5' ili 3' istureni). Enzim je na kraju reakcije termički inaktiviran 5 min na 65°C.

#### **3.5.2.3. Ligacija DNK fragmenata**

Ligacija fragmenata DNK (Maniatis *et al.*, 1982) rađena je mešanjem DNK fragmenta i vektora sa komplementarnim lepljivim krajevima u ligacionom puferu (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, 1 mM ATP) sa 1 U T4 DNK ligaze (Agilent Technologies, SAD) u odgovarajućem odnosu u finalnoj zapremini od 20 µl i inkubiranjem 16 h na 16°C.

#### **3.5.2.4. Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom („Polymerase Chain Reaction“)**

Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom rađeno je tako što je pripremljena reakciona smeša koja sadrži: DNK matricu (0,1-1 ng) u 1 × reakcionom puferu (20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl) sa MgCl<sub>2</sub> u finalnoj koncentraciji 3 mM, dNTP smešu (svaki od dNTP-a u koncentraciji po 200 µM), prajmere (svaki u koncentraciji po 2,5 µM) i 1 U *Taq* DNK polimeraze (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija).

**Tabela 3.** Nazivi i sekvence prajmera koji su korišćeni u ovom radu.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
Agg1 Fw	5'-TTGTAGGAGCCGTTACATCT-3'
Agg1 Rev	5'-TTGTGTGCGATCAACAGTAT-3'
Agg2 Fw	5'-CATATCCTTCGCTAATGCTT-3'
Agg2 Rev	5'-CTTCCCTGGATAGATCACAA-3'
Agg3 Fw	5'-GCTGAACTTCACGGTTG-3'
Agg3 Rev	5'-AGAACCGAAAGTATC-3'
KPFw	5'-GCAAAGCGCCATTCGCC-3'
KPPstIRev	5'-CGTTCCTTCTGCAGTTCCAC-3'
16S1	5'-GAATCTTCCACAATGGACG-3'
16S2	5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAG-3'

Sekvenca koju prepoznaje *PstI* restrikcioni enzim je podvučena.

PCR reakcije u kojima su korišćeni Agg1Fw/Agg1Rev, Agg2FW/Agg2Rev i Agg3Fw/Agg3Rev prajmeri rađene su po sledećem programu: početna denaturacija 7 min na 95°C, umnožavanje DNK fragmenata u 30 ciklusa: denaturacija 30 sek na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 52°C, polimerizacija 1 min na 72°C; poslednji ciklus polimerizacije 7 min na 72°C.

PCR reakcija u kojoj su korišćeni KPFw i KPPstIRev prajmeri rađena je po sledećem programu: početna denaturacija 7 min na 95°C, umnožavanje DNK fragmenata u 30 ciklusa: denaturacija 30 sek na 94°C, vezivanje prajmera 30 sek na 46°C, polimerizacija 1 min na 72°C; poslednji ciklus polimerizacije 7 min na 72°C.

Za sekvenciranje 16S rRNK umnožavanje željenog fragmenata je vršeno uz pomoć prajmera 16S1 i 16S2. PCR reakcija je rađena po sledećem programu: početna denaturacija 7 min na 94°C, umnožavanje DNK fragmenata u 30 ciklusa: denaturacija 30 sek na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 55°C, polimerizacija 30 sek na 72°C; poslednji ciklus polimerizacije je 7 min na 72°C.

Dobijeni PCR produkti su prečišćavani pomoću „QIAquick PCR Purification KIT/250“ (Qiagen GmbH, Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača.

### 3.5.3. Konstrukcija delecija u DNK korišćenjem egzonukleaze III (Exo III)

Egzonukleaza III (Exo III) je enzim koji ima 3' egzonukleaznu aktivnost na dvolančanom DNK molekulu. Konstrukcija delecija rađena je po uputstvu proizvođača kita „Double stranded Nested Deletion Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech). U 25 čistih

mikrotuba alikvotirano je po 3  $\mu$ l S1 smeše (3  $\times$  razblažen 7,5  $\times$  S1 pufer, 0,5 U S1 nukleze), koje su inkubirane na ledu. U posebnoj mikrotubi, 20  $\mu$ l 2  $\times$  ExoIII pufera pomešano je sa 20  $\mu$ l (~ 2  $\mu$ g) digerirane DNK (pAggLbSac-Sal sečen *SacI-EcoRV* restrikcionim enzimima), nakon čega je smeša ekvilibrisana u trajanju od 2-3 min na RT. Sečenjem konstrukata pAggLbSac-Sal restrikcionim enzimima *SacI* i *EcoRV* omogućena je zaštita od digestije ExoIII enzimom sa *SacI* strane (da ne dođe do degradacije vektora) i kontrolisano deletiranje od *EcoRV* restrikcionog mesta (na poziciji 4819) prema 3'-OH kraju *SacI-SalI* fragmenta. U smešu je zatim dodato 1  $\mu$ l ExoIII enzima i od tog momenta je računato vreme reakcije. Iz reakcione smeše su sukcesivno u određenim vremenskim intervalima (na svakih 5 min) do 120. minuta uzimani alikvoti od po 2  $\mu$ l koji su pomešani sa prethodno pripremljenom smešom S1 nukleaze (na ledu). Kada je isteklo i poslednje vreme reakcije svi uzorci su sa leda premešteni na RT i inkubirani u trajanju od 30 min kako bi se omogućila aktivnost S1 nukleaze koja iseca jednolančanu DNK nastali delovanjem ExoIII. Po isteku vremena inkubacije u smeše je dodato po 1  $\mu$ l rastvora za zaustavljanje reakcije (10 mM EDTA), nakon čega su uzorci dalje inkubirani 10 min na 65°C. Po 3  $\mu$ l iz svakog uzorka provereno je na 1% agaroznom gelu (Prilog 3B), a sa ostatkom smeše rađena je recirkularizacija deletanata dodavanjem enzima ligaze po protokolu preporučenom od strane proizvođača.

### 3.5.4. Sekvenciranje DNK

Plazmidi izolovani iz *E. coli* korišćenjem „Qiagen Plasmid Mini-Prep Kit“ i PCR produkti koji su prečišćeni propuštanjem kroz kolonice „QIAquick PCR Purification KIT/250“ su sekvencirani u servisu za sekvenciranje Macrogen, Seul, Koreja (<http://dna.macrogen.com/eng/>). Dobijene sekvence su analizirane pomoću NCBI baze podataka (National Center for Biotechnology Information), BLAST programom (Basic Local Alignment Search Tools) (Altschul *et al.*, 1997) za pretraživanje homologe nukleotidne sekvence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) i Strider programa.

### 3.5.5. Elektroforeza i elucija DNK

#### 3.5.5.1. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu

Elektroforeza totalne DNK, plazmidne DNK i PCR umnoženih fragmenata rađena je na 1% agaroznom gelu. Gelovi su pravljeni rastvaranjem agaroze u 1  $\times$  TAE (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA) puferu uz dodavanje etidijum bromida (0,5  $\mu$ g/ml). Kao pufer za



elektroforezu korišćen je  $1 \times$  TAE pufer. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela. Veličine fragmenata DNK dobijenih posle sečenja restrikcionim enzimima određivane su na agaroznim gelovima upoređivanjem dužine pređenog puta DNK fragmenta koji se analizira u odnosu na dužinu puta koju su prešli DNK fragmenti poznate veličine (standard). Korišćeni su sledeći DNK standardi: „Gene Ruler<sup>TM</sup> DNA 1 kb Ladder Mix“ i „GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder“ (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija).

### **3.5.5.2. Gel elektroforeza u pulsirajućem električnom polju (PFGE)**

PFGE rađena je po metodi koju su opisali Kojić i saradnici (Kojic *et al.*, 2006). Pojedinačne kolonije analiziranih sojeva i derivata sa čvrste podloge zasejane su u GM17 ili MRS medijum i inkubirane na 30°C preko noći. Prekonoćna kultura je potom razblažena 100 puta u odgovarajućem medijumu i inkubirana na 30°C do postizanja log faze rasta ( $OD_{600} = 0,2-0,6$ ). Čelije dobijene obaranjem 1,5 ml prekonoćne kulture oprane su u 1 ml EET pufera (100 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM TRIS, pH 7,5-8,0), a potom je dodato 50  $\mu$ l fenola. Smeša je homogenizovana i opet centrifugirana. Nakon toga fenol je izvučen sa dna mikrotube, a ostatak je centrifugiran, nakon čega je „supernatant“ odliven, a ćelije resuspendovane u 50  $\mu$ l EET pufera. Smeša je potom inkubirana 10 min na 42°C. Po isteku vremena, dodato je 50  $\mu$ l 2 % InCert agaroze (Lonza, Rockland, SAD) istopljene i ohlađene na 42°C u 50  $\mu$ l inkubirane smeše, dobro promešano i izliveno u kalupe koji su ostavljeni na 4°C kako bi polimerisali. Nakon 10 min blokčići su izvučeni iz kalupa i preneti u 500  $\mu$ l rastvora (EET pufer, 0,05% N-lauryl sarcosine, lizozim 4 mg/ml) i inkubirani 24 h na 37°C.

Nakon 24 h, rastvor sa lizozimom je odliven, a blokčići su inkubirani 24 h na 50°C u 500  $\mu$ l rastvora (EET pufer, 0,5% SDS, 0,5  $\mu$ g/ml proteinaza K) koji je prethodno bio preinkubiran 30 min na 50°C. Kada su blokčići postali prozirni (nakon 24 h), rastvor je odliven i agarozni blokčići su oprani rastvorom 0,5 mM PMSF-a rastvorenog u vodi (10 ml) radi inaktivacije Proteinaze K. Smeša je inkubirana 30 min na RT uz blago mućkanje, a potom je postupak ponovljen, odliven je prethodni rastvor i dodato novih 10 ml rastvora PMSF-a. Nakon ponovnog pranja 30 min na RT, prethodni rastvor je odliven, a dodato je 5 ml sterilne bidestilovane vode i ovaj postupak je takođe ponovljen dva puta. Nakon toga blokčići su podvrgnuti digestiji sa *NotI* restrikcionim enzimom. Najpre su agarozni blokčići isečeni na četiri dela pokrovnim staklom i zatim inkubirani 30 minuta u  $1 \times$  puferu za *NotI* restrikcioni enzim (300  $\mu$ l) na RT. Rastvor je zatim odliven i agarozni blokčići su inkubirani 3 sata na 37°C u  $1 \times$  puferu (100  $\mu$ l) kojem je dodat *NotI* enzim. Nakon 3 h inkubiranja,

rastvor je odliven a reakcija je zaustavljena dodavanjem 100  $\mu$ l „STOP PFGE“ pufera (40% saharoza, 100 mM EDTA pH 8,0, brom fenol plavo). Za PFGE korišćen je 1,2% agarozni gel rastvoren u  $0,5 \times$  TBE puferu. Uslovi pod kojima je tekla elektroforeza su konstantna jačina struje od 300 mA, trajanje pulsa od 8 sek u trajanju od 8 h i 18 sek u trajanju od 10 h.

### **3.5.5.3. Elucija DNK fragmenata**

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

### **3.5.6. Konstrukcija plazmidnih biblioteka sojeva BGNJ1-64 i BGSJ2-8 u cilju kloniranja gena koji kodira agregacioni faktor laktobacila**

Nakon izolacije plazmidne DNK sojeva BGNJ1-64 i BGSJ2-8 i prečišćavanja u gradijentu CsCl, rađena je digestija plazmida sledećim restrikcijom enzimima: *EcoRI*, *PstI*, *SacI*, *BamHI* i *Sall*. Dobijeni DNK fragmenti plazmidnih DNK, poreklom iz sojeva BGNJ1-64 i BGSJ2-8, ligirani su u vektor širokog spektra domaćina - pAZILSJ, prethodno linearizovan odgovarajućim restrikcijom enzimima. DH5 $\alpha$  ćelije transformisane su ovim ligacionim smešama. Transformanti koji su nosili konstrukte u DH5 $\alpha$  (bele kolonije na LA podlozi sa X-gal-om) su analizirani na prisustvo velikih fragmenata. Nakon restrikcione analize DNK izolovanih iz velikog broja transformanata, svi konstrukti koji su nosili fragmente različite veličine, poreklom iz plazmida sojeva BGNJ1-64 i BGSJ2-8, korišćeni su za transformaciju heterologog laktokokalnog domaćina - soj BGKP1-20 (Agg<sup>-</sup>). Dobijeni transformanti u soju BGKP1-20, analizirani su praćenjem fenotipa u prekončnoj kulturi (ćelije grupisane na dnu epruvete kao agregati - Agg<sup>+</sup> fenotip ili su homogeno raspoređene u epruveti - Agg<sup>-</sup> fenotip).

### **3.5.7. Genetičke manipulacije u cilju konstrukcije varijanti AggLb proteina**

*XbaI-Sall* fragment iz konstrukta pALb35 subkloniran je u pAZIL vektor, nakon čega je dobijen polazni konstrukt za dalji rad, nazvan pAggLbXS (Tabela 1). Zahvaljujući pogodnom *PstI* restrikcijom mestu, *aggLb* gen je podeljen na dva regiona koja su klonirana u pBlueScript vektor kao *XbaI-PstI* fragment od 3523 bp (pBS-XP) i *PstI-Sall* fragment od 5666 bp (pBS-PS) (Tabela 1). Dalje manipulacije u konstrukciji varijanti su bile bazirane na pogodnoj poziciji *HindIII* i *SspI* restrikcijom mesta u okviru konstrukta pBS-XP i na

pogodnoj poziciji *HindIII* restrikcionih mesta u okviru konstrukta pBS-PS. Konstrukti pBS-XP i pBS-PS su parcijalno sečeni *HindIII* restrikcionim enzimom ponaosob, a potom su recirkularizovani ligiranjem. DH5 $\alpha$  ćelije transformisane su ovim ligacionim smešama. Nakon izolacije plazmida iz dobijenih transformanata, digestije plazmidne DNK restrikcionim enzimima i analize deletanata, dobijeni su sledeći konstrukti: pBS-XP-1, pBS-XP-4 (deletanti konstrukta pBS-XP), pBS-PS-A, pBS-PS-B, pBS-PS-C, pBS-PS-D i pBS-PS-E (deletanti konstrukta pBS-PS (Tabela 1)). *XbaI-PstI* fragment iz konstrukta pBS-XP kloniran je u pCR2.1-TOPO vektor (koji ne sadrži *SspI* restrikciono mesto što vektor čini pogodnim za parcijalnu digestiju *SspI* restrikcionim enzimom), a dobijeni konstrukt nazvan je pCR-XP (Tabela 1). Konstrukt pCR-XP je parcijalno sečen *SspI* restrikcionim enzimom i recirkularizovan ligacijom. DH5 $\alpha$  ćelije transformisane su ovim ligacionim smešama. Nakon izolacije plazmida iz dobijenih transformanata, digestije plazmidne DNK restrikcionim enzimima i analize deletanata dobijeni su sledeći konstrukti: pCR-XP-2 i pCR-XP-3 (Tabela 1). U sledećem koraku, konstrukti koji nose različite varijante prvog dela *aggLb* gena (pBS-XP-1, pBS-XP-4, pCR-XP-2 i pCR-XP-3) kombinovani su sa konstruktima koji nose različite varijante drugog dela *aggLb* gena (pBS-PS-A, pBS-PS-B, pBS-PS-C, pBS-PS-D i pBS-PS-E) u pBlueScript vektoru (Tabela 1).

Da bi se obezbedila uniformna ekspesija svih AggLb varijanti ispred *aggLb* gena je kloniran laktokokalni promotor PlsbB (Uzelac *et al.*, 2015). Naime, promotor PlsbB je ligiran sa *SacI-EagI* fragmentom iz *aggLb* gena, dajući konstrukt pAZIL-pSE (Tabela 1). Potom su sve dobijene kombinacije varijanti *aggLb* gena u pBlueScript vektoru (pBS-PI4E; pBS-PI3C; pBS-PI3D; pBS-PI3E; pBS-PI2B; pBS-PI2D; pBS-PI2E; pBS-PI1A; pBS-PI1D; pBS-PI1E) subklonirane kao *EagI-SalI* fragmenti u pAZIL-pSE (Tabela 1). Nakon ovog koraka, konstruisani su finalni konstrukti: pAZIL-pPI4E, pAZIL-pPI3C, pAZIL-pPI3D, pAZIL-pPI3E, pAZIL-pPI2B, pAZIL-pPI2D, pAZIL-pPI2E, pAZIL-pPI1A, pAZIL-pPI1D i pAZIL-pPI1E. Kloniranjem *EagI-SalI* fragmenta iz pALb35 u pAZIL-pSE dobijen je pAZIL-pPIAggLb. (Tabela 1).

Dodatno, koristeći konstrukt KPPvScI (Kojic *et al.*, 2011) kao matricu i KPFw i KPPstIRev prajmere (Tabela 3), nakon PCR-a i kloniranja PCR fragmenta, dobijen je konstrukt pCRII-KPI koji sadrži prvi deo *aggL* gena (gen za laktokokalni agregacioni faktor - AggL). *BamHI-PstI* fragment iz pCRII-KPI kloniran je u pBS-PS (konstrukt koji sadrži drugi deo agregacionog faktora laktobacila - AggLb, Tabela 1), a odatle, kao *BamHI-XhoI*

fragment, hibridni molekul je subkloniran u pAZIL vektor (prethodno sečen *Bam*HI-*Sa*II). Na ovaj način je dobijen konstrukt pAZIL-pKP-Lb koji nosi prvi deo AggL laktokokalnog proteina i drugi deo AggLb laktobacilusnog proteina (Tabela 1).

### **3.5.8. DNK-DNK hibridizacija (Southern blot)**

#### **3.5.8.1. Prenos DNK sa gela na najlonsku membranu**

Nakon završene elektroforeze DNK na agaroznim gelovima raden je transfer plazmida u cirkularnoj formi i hromozomalne i plazmidne DNK sečene restrikcionim enzimima na najlonsku membranu (SensiBlotPlus Nylon Membrane, MBI Fermentas, Litvanija) po metodi koju je opisao Southern (1975). Agarozni gel je tretiran sa 0,25 M HCl u trajanju od 15 min, da bi se ostvarilo delimično prekidanje molekula DNK uzrokovano depurinacijom. Gel je zatim ispiran u destilovanoj vodi, a denaturacija DNK je vršena potapanjem gela 2 puta po 15 min u rastvor koji sadrži 0,5 M NaOH i 1,5 M NaCl (denaturacioni rastvor). Pre transfera gel je neutralisan u neutralizacionom puferu (1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 7,5) 2 puta po 20 min uz blago mućkanje. Pripremani su listovi Whatman 3MM filter papira odgovarajućih dimenzija. Najlonska membrana na koju će DNK biti prenet, je isečena veličine po 2 mm duže sa svake strane od gela, zatim je potapana u 20 × SSC pufer (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-citrat, pH 7,0). Dva lista 3 MM papira, većeg od gela, su potapani u 20 × SSC pufer (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-citrat) i slagani jedan na drugi. Na njih je stavljan tretiran gel, tako da je strana gela sa DNK bila okrenuta na gore, a oko gela su stavljeni graničnici. Na njega je stavljana najlonska membrana i preko nje još dva navlažena 3 MM papira u 20 × SSC puferu. Pri stavljanju papira vođeno je računa da ne ostanu mehurići vazduha zarobljeni između papira. Preko ovog sendviča je stavljan 10 cm debeo sloj upijajućeg papira i sve je ravnomerno opterećeno tegom od 1 kg. Transfer je vršen preko noći u 20 × SSC puferu.

Posle završenog transfera najlonska membrana sa transferovanom DNK je skinuta i d kratko oprata u 5 × SSC puferu u trajanju od 2 min. Osušena membrana je stavljana između dva 3 MM papira i pečena 2 sata na temperaturi od 80°C u pećnici, čime se postiže fiksiranje DNK za membranu.

### **3.5.8.2. Obeležavanje DNK probe digoksinom**

„DIG DNA Labeling and Detection Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Nemačka) korišćen je za obeležavanje specifične probe. Obeležavanje se ostvaruje tako što najpre dolazi do hibridizacije nasumičnih („random“) oligonukleotida za denaturisanu DNK probu („random primed labeling“), a zatim se komplementarni lanac DNK sintetiše pomoću Klenow-og enzima koji koristi 3' (OH) kraj „random“ oligonukleotida za otpočinjanje polimerizacije i ugrađuje dezoksioligonukleotide od kojih je jedan obeležen digoksinom (DIG-11-dUTP) za produžavanje lanca DNK. DIG-11-dUTP se ugrađuje u novosintetisanu DNK na svakih 20-25 nukleotida. U 1 µg denaturisane probe (PCR proizvod) 10 minuta na 100°C, a zatim ohlađene na ledu je dodavana smeša koja se sastoji od: 2 µl dNTP smeše za obeležavanje (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP i 0,65 mM dTTP i 0,35 mM DIG-11-dUTP, pH 7,5), 2 µl mešavine heksanukleotida (10 × koncentrisan) i 1 µl Klenow enzima (2 U/µl), a finalna zapremina do 15 µl podešena je destilovanom vodom. Dobijena smeša je promešana, kratko centrifugirana i inkubirana preko noći na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8,0. Pre hibridizacije proba se prvo precipitira etanolom (96%, - 20°C) da bi se oslobodila od neugrađenih nukleotida, nakon čega je denaturisana kuvanjem 10 min na temperaturi od 100°C, a zatim prebačena na led do narednog koraka hibridizacije. Na ovaj način je dobijena neradioaktivno obeležena proba.

### **3.5.8.3. Neradioaktivna DNK-DNK hibridizacija**

Za hibridizaciju DNK sa neradioaktivno obeleženom probom je korišćen sledeći protokol: membrana je inkubirana 1 h na 65°C u 20 ml hibridizacionog pufera (5 × SSC, 0,1% N-lauril sarkozil, 0,02% SDS, 1% kazein). Zatim je odliven puffer korišćen za prehibridizaciju i dodat je 1 ml svežeg hibridizacionog pufera na 10 cm<sup>2</sup> membrane u koji je prethodno dodata neradioaktivno obeležena i denaturisana proba. Hibridizacija je rađena preko noći (16 h) na 65°C uz konstantno mućkanje hibridizacionog pufera sa probom. Membrana je nakon hibridizacije oprana dva puta u rastvoru I (2 × SSC, 0,1% SDS) na RT, a zatim dva puta u rastvoru II (0,5 × SSC, 0,1% SDS) na temperaturi od 65°C.

„DIG DNA Labeling and Detection Kit“ korišćen je za detekciju hibrida. Proces detekcije podrazumeva: vezivanje hibridizovane probe sa anti-digoksinom-AP i Fab fragmentima konjugovanim sa alkalnom fosfatidom, kao i vizuelizaciju sa kolorimetrijskim

supstratima NBT/BCIP koji reaguju sa alkalnom fosfatazom. Pranje membrane i detekcija hibrida su vršeni po uputstvu proizvođača (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Nemačka).

### **3.6. Metode rada sa proteinima**

#### **3.6.1. Pripremanje epitopa za indukciju produkcije poliklonskog AggLb antitela**

Za produkciju poliklonskog AggLb antitela (AggLb-Ab) korišćen je inter region AggLb proteina, dužine 190 ak, između kolagen vezujućih domena i CnaB-like domena (od 1096 do 1286 ak), koga poseduju sve varijante AggLb proteina (bez obzira koji deo AggLb proteina im nedostaje). Naime, *HindIII* fragment veličine 560 bp (koji u sebi sadrži jedinstveno *PstI* restrikciono mesto), poreklom iz konstrukta pALb35 kloniran je u pBlueScript vektor. Iz dobijenog konstrukta je subkloniran *BamHI/SalI* fragment u pQE<sub>30</sub> ekspresioni vektor tagovan sa His<sub>6</sub> nakon čega je dobijen konstrukt pQE<sub>30</sub>-AggBS (Tabela 1). Fuzionisani protein ekspimiran je u *E. coli* M15 ćelijama.

#### **3.6.2. Izolacija i prečišćavanje AggBS-His<sub>6</sub> rekombinantnog protein u denaturišućim uslovima**

Izolacija u denaturišućim uslovima i prečišćavanje rekombinantnog proteina rađeno je po uputstvu proizvođača uz minimalne modifikacije protokola (Qiagen, The QIAexpressionist). Izolacija AggBS-His<sub>6</sub> rekombinantnog proteina je vršena iz 50 ml bakterijske kulture u logaritamskoj fazi rasta (*E. coli* M15 ćelije koje nose konstrukt pQE<sub>30</sub>-AggBS). Nakon što je uzet alikvot (2 ml) neindukovanih ćelija (NI), u kulturu je dodat IPTG (izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid, finalna koncentracija 1 mM) u cilju indukcije ekspresije AggBS-His<sub>6</sub> rekombinantnog proteina u trajanju od 2 h uz kultivaciju na 37°C sa aeracijom. Po isteku indukcije, uzet je alikvot (2ml) indukovanih bakterija (I), potom su ćelije oborene (4500 rpm, 10 min, klinička centrifuga 5804R), a talog je resuspendovan u puferu za lizu koji sadrži: 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8,0 u koji je dodato 1mg/ml lizozima (5 ml pufera za lizu dodato je po 1g ćelijskog taloga), potom je inkubiran 30 min na ledu. Lizirane ćelije su zatim podvrgnute sonikaciji (5 pulseva 80% snage u trajanju od 10 sek, Soniprep 150, Engleska) da bi se degradovala genomska DNK i smanjila viskoznost, nakon čega je suspenzija prebačena u čiste mikrotube i centrifugirana (13000 rpm, 30 min, RT, centrifuga 5415D). Supernatant iz svih mikrotuba je sjedinjen i inkubiran sa Ni-NTA agarozom (1 ml Ni-NTA agroze dodat je na 4 ml lizata) u trajanju od 1 h na 4°C uz konstanto mešanje. Potom je smeša nanešena na kolonu, a uzorak je ispiran u etapama sa po 500 μl

pufera C (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 6,3), pufera D (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 5,9) i na kraju pufera E (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 4,5), pri čemu su sve skupljene frakcije sačuvane. SDS-poliakrilamidni gel (SDS-PAGE) totalnih proteina uzoraka uzetih u svim navedenim fazama izolacije u denaturišućim uslovima i prečišćavanja AggBS-His<sub>6</sub> rekombinantnog proteina prikazani su u Prilogu 1. U cilju odsoljavanja finalnog uzorka (uzorak E2; Prilog 1) rađena je dijaliza ultrafiltracijom po uputstvu proizvođača (Centrifugal Filter Units, Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices, 3K, Millipore). Produkcija poliklonskih antitela na AggLb je rađena imunizacijom miševa u ICGEB-u, Trst, Italija.

### **3.6.3. Određivanje koncentracije proteina u uzorku**

Određivanje koncentracije proteina u datom uzorku rađeno je Bradfordovim esejom (Bradford, 1976). Kao standard za pravljenje standardne krive korišćen je BSA protein poznatih koncentracija. Pripremljeno je nekoliko razblaženja proteinskog standarda u opsegu 1-25 µg/ml proteina. U 0,8 ml standarda, uzoraka i blanka dodavano je 0,2 ml 5 × Bradfordovog reagensa. Nakon inkubacije 5 min na RT merena je optička gustina na 595 nm na UltraSpec 3300 pro aparatu (Amersham Biosciences, Biochrom Ltd., Cambridge, Engleska). Iz standardne krive je očitivana nepoznata koncentracija proteina.

### **3.6.4. Elektroforeza proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)**

SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) vršena je po opisanoj proceduri (Laemmli *et al.*, 1970). Uzorci totalnih proteina bakterija su pripremani centrifugiranjem 2ml bakterijskih kultura u logaritamskoj fazi rasta (13000 rpm, 2 min, centrifuga 5415D), ćelije su potom resuspendovane u puferu za uzorak (125mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 20% glicerol, 0,05% brom fenol plavo - BPB, 5% β-merkaptioetanol). Uzorci su sonifikovani (Soniprep 150, Engleska) 5 puta po 15 sek, a zatim prokuvani 2 min na 100°C (denaturacija), nakon čega su uzeti alikvoti za SDS-PAGE.

Korišćena je aparatura za miniVE vertikalnu elektroforezu firme Hoeffler (Hoeffler, Amersham Biosciences, CA, SAD). Pravljen je diskontinuiran sistem gelova, koji se sastojao iz gela za koncentrovanje i gela za razdvajanje. Koncentracije komponenti u gelu za koncentrovanje su bile sledeće: 7% akrilamid/bisakrilamid, 117 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% amonijum persulfat i 0,1% TEMED. Finalne koncentracije komponenti u gelu za razdvajanje su: 15% akrilamid/bisakrilamid, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1%

amonijum persulfat i 0,1% TEMED. Gel za razdvajanje je nalivan do oko 3/4 zapremine ploča, a u ostatak je nalivan gel za koncentrovanje.

Pufer za elektroforezu je sadržavao 25 mM Tris pH 8,3, 186 mM glicin i 0,1% SDS. Elektroforeza je tekla pri konstantnoj struji od 25 mA u trajanju od 2-3h. Gelovi su bojени komazi-plavim (Comassie brilliant blue R250) u rastvoru sastava: 45% metanol, 45% voda, 10% sirćetna kiselina i 0,25% komazi plavo, 3-4 h uz mešanje. Odbojavanje gelova je vršeno u rastvoru sastava: 20% metanol, 70% voda i 10% sirćetna kiselina, uz mešanje. Rastvor za odbojavanje menjan je na svaka 3-4 h. Obnavljanje rastvora za odbojavanje je vršeno filtriranjem kroz aktivni ugalj, koji za sebe vezuje komazi plavo. Nakon odbojavanja, gelovi su čuvani u odbojivaču na 4°C.

### 3.6.5. Dot-blot analiza

Dot-blot analiza rađena je po modifikovanoj metodi koju su opisali Niedergang i saradnici (Niedergang *et al.*, 2000). PVDF membrana (Merck Millipore, Darmstadt, Nemačka) je pripremljena na sledeći način: potopljena je 15 sek u metanolu, 2 min u bidestilovanoj vodi i 5 min u B puferu (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8,0). Potom su lagano naneti uzorci na membranu (po 2 µl svakog uzorka iz serija razblaženja), membrana je osušena na RT i inkubirana preko noći (16 h) na 4°C u 10% mleku rastvorenom u TBS puferu (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) koji sadrži 0,1% Tween-a 20 (TBS-T). Posle zasićenja, membrana je inkubirana 1 h sa primarnim antitelom (AggLb-Ab) resuspendovanim u 5% mleku rastvorenom u TBS-T puferu u odnosu 1:1000. Nakon pranja (1 h u TBS-T puferu), membrana je inkubirana 1 h u 5% mleku rastvorenom u TBS-T puferu u kojem je resuspendovano anti-mišije antitelo konjugovano sa peroksidazom rena (HRP) (Sigma, Nemačka) u odnosu 1:10000. Signal je detektovan koristeći EMD Millipore Immobilon<sup>TM</sup> Western Chemiluminescent HRP Substrate (ECL) (Fisher Scientific, SAD) prateći uputstvo proizvođača.

### 3.7. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišćen je Studentov t-test.

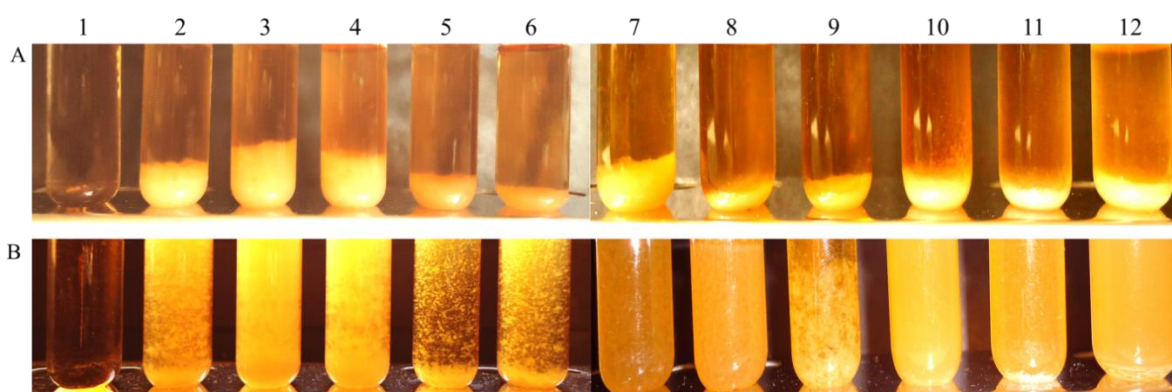


## **4. REZULTATI**

## 4. REZULTATI

### 4.1. Odabir sojeva roda *Lactobacillus* na osnovu agregacionog fenotipa

Kolekciju mikroorganizama LMM čini oko hiljadu izolata laktobacila izolovanih iz tradicionalnih fermentisanih mlečnih proizvoda poreklom sa različitih lokaliteta Republike Srbije i iz regiona. Pretraživanjem kolekcije na prisustvo sojeva koji poseduju sposobnost agregacije odabrano je 11 izolata laktobacila koji pokazuju sposobnost autoagregacije u prekonoćnoj kulturi (BGSJ2-8, BGGR2-68, BGGR2-82, BGDP1-84, BGDP9-38, BGNJ1-3, BGNJ1-61, BGNJ1-64, BGNJ1-70, BGZLS30-6 i BGAR75) (Slika 3). Odabrani prirodni izolati laktobacila koji autoagregiraju, su ranije determinisani na osnovu homologije dela sekvence gena za 16S rRNK (Lozo *et al.*, 2007; Nikolic *et al.*, 2010). Sojevi BGNJ1-64 i BGDP9-38 determinisani su u ovom radu, poređenjem dobijenih sekvenci PCR produkata (umnoženih pomoću prajmera 16S1 i 16S2) sa sekvencama iz NCBI baze podataka (Tabela 1, Materijal i metode).



**Slika 3.** Agregacija odabranih sojeva roda *Lactobacillus* iz kolekcije mikroorganizama LMM (A) nakon rasta u tečnoj kulturi i (B) posle vorteksovanja. Redosled: 1 - medijum za rast (kontrola) ; 2 - BGSJ2-8; 3 - BGGR2-68; 4 - BGGR2-82; 5 - BGDP1-84; 6 - BGDP9-38; 7 - BGNJ1-3; 8 - BGNJ1-61; 9 - BGNJ1-64; 10 - BGNJ1-70; 11 - BGZLS30-6; 12 - BGAR75.

Za soj BGSJ2-8 je konstatovano da se kultivacijom bakterija sa  $-80^{\circ}\text{C}$  na  $30^{\circ}\text{C}$  dobijaju spontani derivati na čvrstom medijumu koji nemaju sposobnost agregacije (BGSJ2-81,  $\text{Agg}^-$ ), a za soj BGNJ1-64 derivat koji ne agregira (BGNJ1-641,  $\text{Agg}^-$ ) je dobijen metodom čišćenja plazmida (za detalje videti 3.4.2. Materijal i metode). Ova dva derivata koja nemaju sposobnost agregacije su korišćena kao izogene negativne kontrole u testovima.

Primećeno je da bakterijske ćelije Agg<sup>-</sup> derivata BGSJ2-81 i BGNJ1-641 na petri šoljama formiraju kolonije drugačije morfologije (pljosnate i providne) u odnosu na okruglaste mlečno-bele kolonije Agg<sup>+</sup> parentalnih sojeva BGSJ2-8 i BGNJ1-64 (Lozo *et al.*, 2007).

#### 4.1.1. Stepen autoagregacije odabranih sojeva roda *Lactobacillus*

U cilju međusobnog poređenja sojeva po brzini autoagregacije i tipu formiranih agregata, praćena je autoagregacija odabranih sojeva tokom 5 h, merenjem apsorbance na 600 nm (OD<sub>600 nm</sub>) i preraćunavanjem procenta ćelija koje agregiraju u odnosu na početnu optićku gustinu bakterijskih suspenzija (Tabela 4).

**Tabela 4.** Autoagregacija odabranih sojeva roda *Lactobacillus*, praćena tokom 5 h. Prikazane su prosećne vrednosti tri nezavisna eksperimenta sa standardnom devijacijom.

Prirodni izolat	Autoagregacija (%)				
	1h	2h	3h	4h	5h
BGSJ2-8 <sup>+</sup>	41,62 ± 0,71	48,12 ± 0,85	51,51 ± 0,42	56,84 ± 1,12	59,81 ± 0,63
BGGR2-68 <sup>+</sup>	45,23 ± 0,93	54,22 ± 0,09	63,39 ± 1,93	69,59 ± 0,40	72,99 ± 0,64
BGGR2-82 <sup>+</sup>	13,52 ± 0,74	16,09 ± 1,94	23,48 ± 2,43	35,26 ± 1,38	38,26 ± 0,43
BGDP1-84 <sup>+</sup>	41,43 ± 1,29	49,14 ± 1,06	52,87 ± 0,85	56,76 ± 1,95	58,81 ± 1,69
BGDP9-38 <sup>+</sup>	14,63 ± 0,33	25,28 ± 1,14	37,85 ± 1,84	44,27 ± 1,01	50,57 ± 1,64
BGNJ1-3 <sup>+</sup>	20,43 ± 0,62	27,48 ± 0,98	37,16 ± 1,37	43,65 ± 1,57	48,33 ± 0,63
BGNJ1-61 <sup>+</sup>	44,77 ± 1,76	46,25 ± 1,11	62,19 ± 2,01	67,62 ± 1,43	73,58 ± 0,79
BGNJ1-64 <sup>+</sup>	40,14 ± 1,85	46,38 ± 1,52	52,87 ± 0,42	58,41 ± 1,75	62,98 ± 0,59
BGNJ1-641 <sup>-</sup>	5,86 ± 0,65	7,09 ± 1,56	14,52 ± 1,42	18,94 ± 1,97	24,65 ± 1,02
BGNJ1-70 <sup>+</sup>	66,04 ± 0,69	69,61 ± 1,60	74,72 ± 1,31	75,65 ± 0,91	81,34 ± 1,34
BGZLS30-6 <sup>+</sup>	20,39 ± 1,86	28,26 ± 1,38	34,27 ± 2,15	40,28 ± 0,72	45,80 ± 1,81

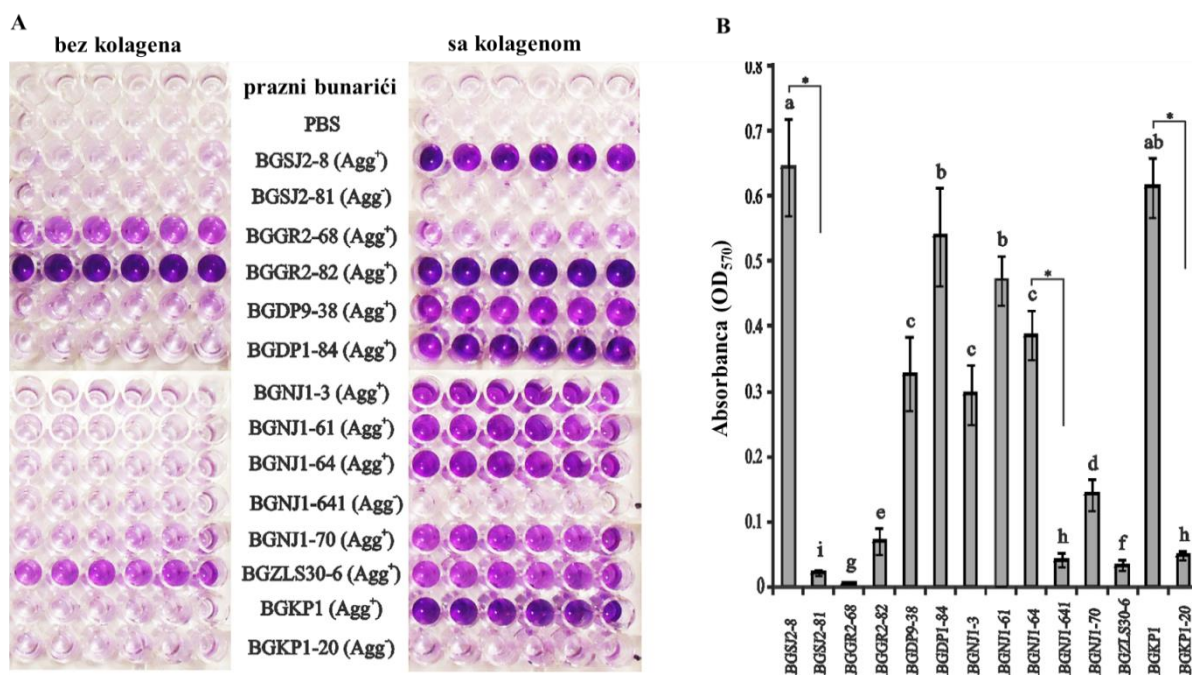
<sup>+</sup> - soj poseduje sposobnost autoagregacije, <sup>-</sup> - soj ne poseduje sposobnost autoagregacije.

Soj BGNJ1-70 je najbrže agregirao (66,04% nakon 1h/81,34% nakon 5h). Sojevi BGSJ2-8, BGGR2-68, BGDP1-84, BGNJ1-61 i BGNJ1-64 su pokazali visok stepen autoagregacije kako nakon 1h (> 40%) tako i nakon 5h, dok su sojevi BGGR2-82, BGDP9-38, BGNJ1-3 i BGZLS30-6 sporije formirali agregate u odnosu na prethodno pomenute izolate. Agregati ćelija sojeva BGSJ2-8, BGGR2-68, BGDP1-84, BGNJ1-61, BGNJ1-64 i BGNJ1-70 su imali izgled krupnih pahuljica, koje nakon što se natalože na dno epruvete ostavljaju vizuelno čist, skoro potpuno providan medijum iznad svojih agregata. Agregati ćelija sojeva BGGR2-82, BGDP9-38, BGNJ1-3 i BGZLS30-6 su bili sitniji, izgleda koji više podseća na prašinu ili sitnije pahuljice koje su sporije padale na dno epruvete. Praćenjem procenta autoagregacije derivata BGNJ1-641 (izogeni Agg<sup>-</sup> derivat soja BGNJ1-64 dobijen čišćenjem plazmida) pokazano je da ukupan broj spontano palih ćelija na dno epruvete iznosi

24,65% nakon 5 h, što je skoro upola manje od ukupnog broja ćelija soja BGNJ1-64 koje agregiraju već nakon 1 h (40,14%). Soj BGAR75 nije uključen u eksperimente analize stepena autoagregacije, kao i u neke od narednih eksperimenata, s obzirom da pomenuti soj zahteva posebne uslove rasta i primećeno je da sposobnost formiranja agregata nije uvek detektabilno svojstvo.

#### 4.1.2. Sposobnost vezivanja odabranih sojeva za imobilisani kolagen

Pretpostavlja se da su agregacioni proteini odgovorni za neke od probiotičkih karakteristika bakterija roda *Lactobacillus* koje se ostvaruju kroz interakciju sa proteinima ECM-a, tako da je detaljnija karakterizacija agregacionih faktora bitna za razumevanje njihovog doprinosa u interakciji probiotičkih bakterija sa molekulima na površini enterocita u GI traktu. S obzirom da je kolagen jedan od najzastupljenijih proteina ECM-a, odabrani sojevi roda *Lactobacillus* koji poseduju sposobnost autoagregacije testirani su na sposobnost vezivanja za imobilisani kolagen na ploči (Slika 4).



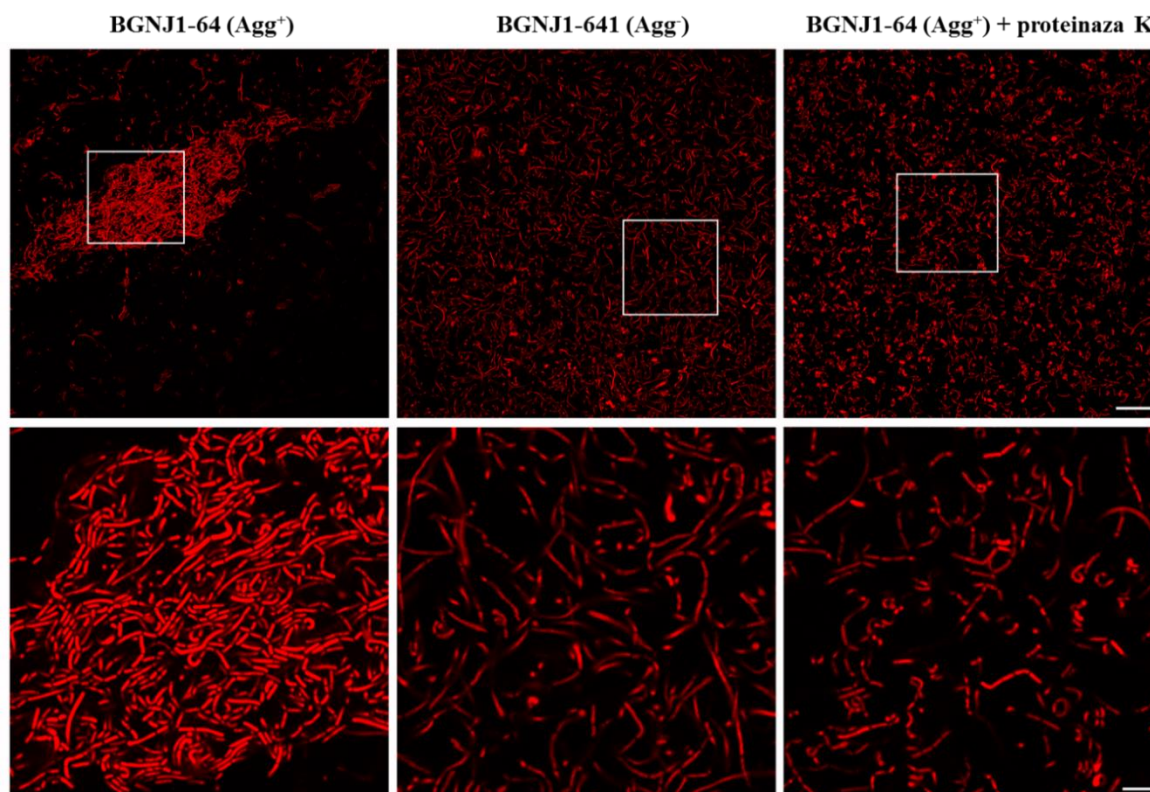
**Slika 4.** Analiza vezivanja za imobilisani kolagen. Vezivanje odabranih sojeva roda *Lactobacillus* (uključujući kontrolne sojeve) za imobilisani kolagen (A) na ploči i (B) grafički prikaz rezultata. Prikazane su srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta sa standardnom devijacijom. Zvezdice pokazuju statistički značajnu razliku ( $p < 0,001$ ) između sojeva koji imaju sposobnost autoagregacije i njihovih derivata koji nemaju sposobnost autoagregacije. Svaki stubić koji ne deli isto slovo je statistički međusobno različit ( $P < 0,05$ ).

Ustanovljeno je da se većina sojeva laktobacila sa sposobnošću autoagregacije vezuje veoma intenzivno za imobilisani kolagen. Sojevi BGSJ2-8, BGDP1-84, BGDP9-38, BGNJ1-3, BGNJ1-61 i BGNJ1-64 pokazuju visok stepen adherentnosti, dok kod soja BGGR2-68 sposobnost vezivanja za matriks nije detektovana. Kao dodatna kontrola vezivanja u eksperimentu je korišćen laktokokalni soj *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1 koji poseduje sposobnost agregacije. Agg<sup>-</sup> derivati (BGSJ2-81, BGNJ1-641 i BGKP1-20) su pokazali potpuno odsustvo sposobnosti vezivanja za kolagen ukazujući na direktnu vezu između prisustva agregacionog faktora i vezivanja za kolagen (statistički značajno,  $p < 0.001$ ). Zapaženo je da sojevi BGGR2-68 i BGGR2-82 poseduju sposobnost vezivanja za plastiku tj. formiranja biofilma u odnosu na ostale analizirane sojeve laktobacila (Slika 4A).

#### **4.2. Karakterizacija prirode agregacionog faktora koji utiče na sposobnost autoagregacije odabranih sojeva roda *Lactobacillus***

Do sada je pokazano da su agregacioni faktori eksprimirani u BMK, površinski proteini različite molekulske mase. U cilju ustanovljavanja proteinske prirode faktora autoagregacije kod odabranih laktobacila, soj *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 (slučajnim odabirom u okviru grupe selektovanih sojeva roda *Lactobacillus*) je tretiran proteinazom K. Tretman proteinazom K doveo je do potpunog gubitka sposobnosti autoagregacije soja BGNJ1-64, što je ukazalo na proteinsku prirodu faktora koji obezbeđuje autoagregaciju.

Kako bi se eksperimentalno dokazala uloga agregacionih proteina u međusobnom povezivanju bakterija, tretirane/netretirane ćelije soja BGNJ1-64 su bojene heksidijum jodidom, nakon čega su pripremljeni preparati koji su posmatrani na konfokalnom mikroskopu (Slika 5). Konfokalnom mikroskopijom je ustanovljeno da agregacioni faktor (protein) dovodi do slepljivanja bakterijskih ćelija koje formiraju vidljive agregate (Slika 5, BGNJ1-64), dok tretman proteinazom K dovodi do njihovog razdvajanja (Slika 5, BGNJ1-64 + proteinaza K), pri čemu se zapaža identična organizacija ćelija kao i kod Agg<sup>-</sup> derivata BGNJ1-641 (Slika 5, BGNJ1-641). Ovim eksperimentom je dodatno potvrđena proteinska priroda faktora koji dovodi do međusobne interakcije bakterijskih ćelija laktobacila.



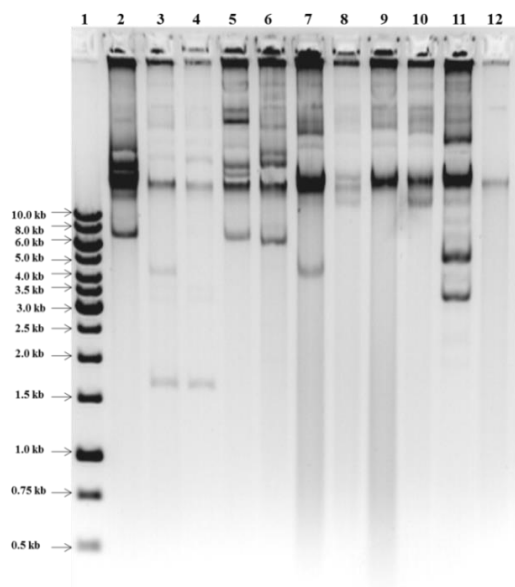
**Slika 5.** Konfokalna mikroskopija soja *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64. BGNJ1-64 ( $\text{Agg}^+$ ) - mikroskopska analiza soja koji poseduje sposobnost autoagregacije; BGNJ1-641 ( $\text{Agg}^-$ ) - mikroskopska analiza soja koji ne poseduje sposobnost autoagregacije; BGNJ1-64 ( $\text{Agg}^+$ ) + proteinaza K - mikroskopska analiza soja BGNJ1-64 tretiranog proteinazom K. Uokvireni delovi slika u gornjem panelu (25  $\mu\text{m}$ ) predstavljeni su uvećano u donjem panelu (5  $\mu\text{m}$ ). Bakterije su bojene fluorescentnom bojom - heksidijum jodidom (maksimum ekscitacije na 480 nm i maksimum emisije na 625 nm).

#### 4.2.1. Odabrani sojevi laktobacila eksprimiraju novi agregacioni faktor

Prilikom analize brzine autoagregacije i tipa agregata koje formiraju odabrani  $\text{Agg}^+$  sojevi laktobacila ustanovljeno je da većina od njih (BGSJ2-8, BGGR2-68, BGDP1-84, BGNJ1-61, BGNJ1-64 i BGNJ1-70) eksprimiraju fenotip veoma sličan laktokokalnom soju BGKP1 (Kojic *et al.*, 2011). Da bi se utvrdilo da li odabrani  $\text{Agg}^+$  sojevi laktobacila poseduju isti ili sličan gen za agregacioni protein *aggL* genu laktokoka urađena je DNK-DNK hibridizacija (Southern blot) totalne DNK izolovane iz odabranih  $\text{Agg}^+$  sojeva sečene *EcoRI* restrikcionim enzimom sa *aggL* genom kao probom na 55°C. Rezultat hibridizacije je pokazao da odabrani  $\text{Agg}^+$  sojevi laktobacila ne poseduju gen homolog *aggL* genu laktokoka (rezultat nije prikazan u radu jer je negativan). S obzirom da gen/i koji kodira/ju agregacioni/e faktor/e u odabranim  $\text{Agg}^+$  sojevima laktobacila je novi gen/i pristupilo se daljoj karakterizaciji agregacionih faktora laktobacila i gena koji ih kodiraju.

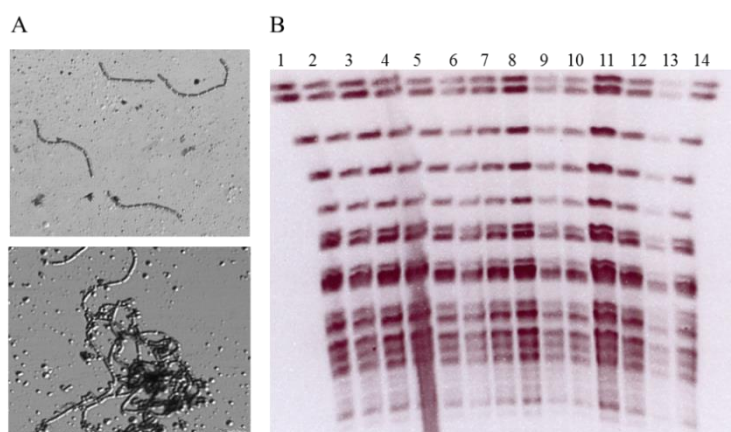
### 4.3. Lokalizacija gena koji kodiraju za faktore koji utiču na sposobnost autoagregacije odabranih sojeva roda *Lactobacillus*

Za laktokokalni soj BGKP1 ustanovljeno da je gen koji kodira agregacioni faktor AggL lociran na plazmidu pKP1 od 16,1 kb (Kojic *et al.*, 2011). Dodatno, u ranijim laboratorijskim istraživanjima je pokazano da u sojevima BGSJ2-8 i BGZLS30-6, nakon presejavanja sa -80°C na 30°C, neke ćelije spontano gube sposobnost autoagregacije. Ovaj fenomen se može najlogičnije objasniti time da je/su gen/geni koji kodiraju agregacioni protein odgovoran za sposobnost soja da agregira u tečnoj kulturi lociran/i na plazmidu/ima koji su strukturno i/ili segregaciono nestabilni pri presejavanju. Stoga, u cilju potvrđivanja plazmidne lokalizacije gena za agregacioni faktor u analiziranim sojevima roda *Lactobacillus*, pre svega, je urađena izolacija i provera prisustva plazmida u odabranim sojevima. Nakon izolacije i elektroforeze plazmidne DNK, uočen je veoma raznovrstan plazmidni sastav u okviru grupe odabranih Agg<sup>+</sup> sojeva roda *Lactobacillus* (Slika 6). Konstatovano je da svi analizirani sojevi laktobacila poseduju velike plazmide (veličine preko 20 kb), dok neki poseduju i manje plazmide što je ukazalo na mogućnost plazmidne lokalizacije gena za agregacioni faktor.



**Slika 6.** Elektroforeza plazmidne DNK izolovane iz odabranih sojeva roda *Lactobacillus* na 1% agaroznom gelu. Redosled: 1 - marker (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder); 2 - BGSJ2-8; 3 - BGGR2-68; 4 - BGGR2-82; 5 - BGDPI-84; 6 - BGDPI-38; 7 - BGNJ1-3; 8 - BGNJ1-61; 9 - BGNJ1-64; 10 - BGNJ1-70; 11 - BGZLS30-6; 12 - BGAR75.

U cilju eksperimentalne potvrde navedene pretpostavke (potvrđivanje plazmidne lokalizacije gena za agregacioni faktor u odabranim sojevima roda *Lactobacillus*), rađeni su eksperimenti čišćenja plazmida iz sojeva BGSJ2-8 (koji spontano gubi sposobnost autoagregacije) i BGNJ1-64 (kod koga je autoagregacija stabilno svojstvo). Pored Agg<sup>-</sup> derivata soja BGSJ2-8, u ovom radu dobijen je i derivat soja BGNJ1-64 koji je izgubio sposobnost autoagregacije, nazvan BGNJ1-641. U sledećem koraku, rađena je izolacija plazmidne DNK iz derivata BGNJ1-641 koji je izgubio sposobnost autoagregacije i poređenje dobijenog plazmidnog profila sa plazmidnim profilom divljeg soja BGNJ1-64 (Agg<sup>+</sup>) (rezultati nisu prikazani u radu). Eksperimentom čišćenja plazmida je potvrđena plazmidna lokalizacija gena za agregacioni faktor u analiziranom soju BGNJ1-64 tj. odsustvo definisanih plazmida u čišćenim sojevima u odnosu na divlji soj, što se može dovesti u korelaciju sa gubitkom fenomena autoagregacije kod očišćenog derivata BGNJ1-641.



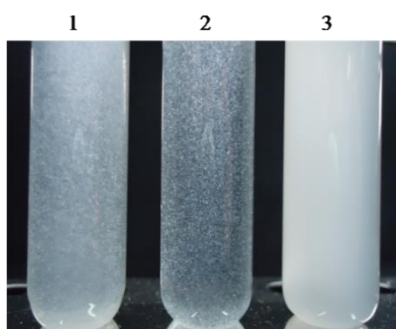
**Slika 7.** Provera izogenog BGNJ1-641 derivata (Agg<sup>-</sup>) soja BGNJ1-64 (Agg<sup>+</sup>). (A) Mikroskopski preparati dobijenog derivata BGNJ1-641 i parentalnog soja BGNJ1-64; (B) Prikaz rezultata PFGE, 1-12 - BGNJ1-641, 13 i 14 - BGNJ1-64. Totalna DNK sečna *NotI* restrikcionim enzimom i razdvojena na 1,2% agaroznom gelu pod uslovima pulsirajućeg električnog polja koje je trajalo 8 sekundi sever/jug i 8 sekundi istok/zapad (8 h) i 18 sekundi sever/jug i 18 sekundi istok/zapad (10 h).

Dodatno, napravljeni su mikroskopski preparati dobijenog derivata BGNJ1-641 (Slika 7A gore) i parentalnog soja BGNJ1-64 (Slika 7A dole) na osnovu kojih se može uočiti odsustvo fenomena autoagregacije na preparatu derivata BGNJ1-641, odnosno prisustvo pomenutog svojstva na preparatu soja BGNJ1-64. U cilju isključivanja mogućnosti kontaminacije prilikom eksperimentalnog protokola čišćenja plazmida, urađena je PFGE *NotI* makrorestrikciona analiza polaznog soja (BGNJ1-64) i Agg<sup>-</sup> derivata (BGNJ1-641) kojom je potvrđeno da je derivat BGNJ1-641 izogeni soj polaznog soja BGNJ1-64 (Slika 7B).



#### 4.4. Kloniranje gena koji kodira agregacioni faktor laktobacila i njegova ekspresija u heterologim domaćinima

S obzirom da agregacioni faktori laktobacila mogu biti proteini izuzetno velike molekulske mase (više od 300 kDa), prilikom konstrukcije plazmidnih biblioteka sojeva BGNJ1-64 i BGSJ2-8, bilo je neophodno voditi računa o veličini fragmenata koji sadrže intaktan gen sa okolinom koja omogućava ekspresiju (očekivani su fragmenti DNK veći od 10 kb) zbog čega su korišćeni različiti restrikcioni enzimi (*EcoRI*, *PstI*, *SacI*, *BamHI* i *SalI*) za digestiju plazmidne DNK. Dobijeni DNK fragmenti plazmidnih DNK, poreklom iz sojeva BGNJ1-64 i BGSJ2-8, klonirani su u vektor širokog spektra domaćina – pAZILSJ. Svi konstrukti koji su nosili fragmente različite veličine, poreklom iz plazmida sojeva BGNJ1-64 i BGSJ2-8, korišćeni su za transformaciju heterologog laktokokalnog domaćina - soj BGKP1-20 ( $\text{Agg}^-$ ). Dobijeni transformanti soja BGKP1-20 analizirani su praćenjem sposobnosti agregacije u prekončnoj kulturi (ćelije grupisane na dnu epruvete kao agregati -  $\text{Agg}^+$  fenotip ili su homogeno raspoređene u epruveti -  $\text{Agg}^-$  fenotip). Rezultati ovog eksperimenta su pokazali da jedan konstrukt (pALb35), koji nosi *SacI* fragment, poreklom iz plazmida soja BGNJ1-64, obezbeđuje ponovnu pojavu autoagregacionog fenotipa transformisanog heterologog domaćina BGKP1-20 ( $\text{Agg}^-$ ). Naime, ustanovljeno je da je sposobnost autoagregacije derivata BGKP1-20/pALb35 posledica ekspresije gena koji se nalazi u okviru konstrukta pALb35 korišćenog za transformaciju soja BGKP1-20 (Slika 8).



**Slika 8.** Ekspresija gena koji kodira agregacioni faktor laktobacila u heterologom domaćinu - BGKP1-20. Prekončne kulture oprane u PBS puferu sojeva: 1 - BGKP1-20/pALb35; 2 - BGKP1-20/pALb35 (dilucija prekončne kulture BGKP1-20/pALb35 u cilju preglednijeg prikaza rezultata); 3 - BGKP1-20 (kontrolna/laktokokalni domaćin koji ne poseduje sposobnost agregacije).

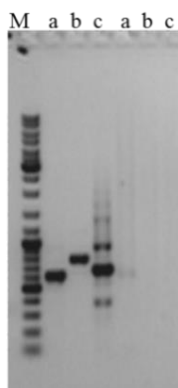
Za ekspresiju gena koji kodira agregacioni faktor laktobacila odabran je laktokokalni domaćin BGKP1-20, s obzirom da je izogeni  $\text{Agg}^-$  derivat BGNJ1-641 netransformabilan

(čak i nakon vešestrukih pokušaja optimizacije metode transformacije laktobacila). Dodatno, urađena je i transformacija soja *Enterococcus faecalis* BGZLS10-27 (Agg<sup>-</sup>), odnosno ekspresija konstrukta pALb35 u enterokokalnom domaćinu, nakon čega je dobijen derivat BGZLS10-27/pALb35 koji je posedovao sposobnost agregacije (Agg<sup>+</sup>) (Tabela 1).

#### 4.5. Sekvenciranje i molekularna karakterizacija konstrukta pALb35

Konstrukt pALb35 je kompletno sekvenciran korišćenjem metodologije „primer walking“, a na osnovu analize nukleotidne i aminokiselinske sekvence utvrđeno je prisustvo jednog novog otvorenog okvira čitanja (open reading frame - ORF) nazvanog *aggLb* gen koji je okružen sa još tri ORF-a koji kodiraju za transpozaze (pregled položaja okolnih gena u odnosu na *aggLb* gen dat je u Prilogu 2, *aggLb* gen predstavljen je crvenom strelicom, dok su okolni geni predstavljeni zelenim strelicama).

U cilju potvrđivanja samostalnog doprinosa *aggLb* gena u autoagregaciji derivata BGKP1-20/pALb35 rađeni su eksperimenti subkloniranja *aggLb* gena. Međutim, prilikom subkloniranja uočena su neslaganja između restrikcionih profila dobijenih nakon elektroforeze na gelu i očekivanih veličina fragmenata na osnovu nukleotidne sekvence koja je dobijena sekvenciranjem konstrukta pALb35. Dodatno, nakon PCR reakcije u kojoj je korišćen konstrukt pALb35 kao matrica i prajmeri: Agg1Fw/Agg1Rev, Agg2Fw/Agg2Rev i Agg3Fw/Agg3Rev (koji su dizajnirani na osnovu sekvence dobijene sekvenciranjem konstrukta pALb35) na gelu je uočeno da treći set prajmera multiplikuje signale različitih veličina, a koji nisu posledica neoptimizacije uslova za PCR reakciju (Slika 9).



**Slika 9.** Elektroforeza PCR-om amplifikovanih fragmenata koristeći prajmere: a - Agg1Fw/Agg1Rev, b - Agg2Fw/Agg2Rev; c - Agg3Fw/Agg3Rev i konstrukt pALb35 kao matricu (prva tri uzorka na gelu nakon markera); negativna kontrola PCR reakcije (poslednja tri uzorka na gelu); M - marker (GeneRuler DNA Ladder Mix).

Pomenuti eksperimentalni rezultati ukazivali su na prisustvo dela sekvence u okviru konstrukta pALb35, odnosno *aggLb* gena, koji je nakon sekvenciranja i dalje ostao nepoznat. Razlog za to predstavljale su više puta ponovljene skoro identične sekvence određenog regiona u okviru *aggLb* gena. Na osnovu detaljne analize restrikcionih profila pALb35 sekvence, primenom većeg broja različitih kao i kombinacijom restrikcionih enzima (*ApaI*, *BglII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *NcoI*, *NotI*, *PstI*, *SphI*, *XbaI*, *SacI/ScaI*, *SacI/SalI*, *XbaI/SalI*), shematski je prikazan pretpostavljen nepoznati region sekvence u okviru konstrukta pALb35 (Prilog 2, prikazano žutom bojom).

U cilju prevazilaženja opisanog eksperimentalnog problema, a usled inherentnih tehničkih ograničenja u sekvenciranju, primenjene su sledeće strategije subkloniranja nepoznatog regiona sekvence u okviru konstrukta pALb35:

- a) subkloniranje svih *HindIII* fragmenata unutar konstrukta pALb35, a koji se nalaze u okviru jednog od *SphI* fragmenta (čija je očekivana veličina na osnovu sekvence iznosila 1729 bp, dok je nakon elektroforeze na gelu bila realne veličine >5 kb) u pBlueScript vektoru (Prilog 3A). Primenom ovog pristupa dobijeni su sledeći konstrukti: SH4, 2Hind, 18Hind, 23Hind i 34Hind (Tabela1) koji su sekvencirani.
- b) vremenski determinisana deleciona biblioteka koristeći tretman enzimima: ExoIII i S1 nukleaza (Prilog 3B). Primenom ovog pristupa dobijeni su sledeći konstrukti: Exo2-2, Exo12-4, Exo17-1, Exo19-4 i Exo25-5 (Tabela 1) koji su sekvencirani.
- c) kloniranje *HincII* i *SspI* fragmenata iz pALb35 u pBlueScript vektor (prethodno sečen *SmaI* restrikcionim enzimom). Primenom ovog pristupa dobijen je konstrukt 5HincII koji nosi *HincII* fragment i istovremeno sadrži *SspI* fragment koji je i nezavisno kloniran u pBlueScript vektor, a konstrukt je nazvan 3SspI (Tabela 1; Prilog 3D). Konstrukti 5HincII i 3SspI su sekvencirani.

U prvom koraku analize, preklapanjem sekvenci dobijenih konstrukata primenom prvog i drugog pristupa, uspešno je složen veliki deo nepoznate sekvence (Prilog 3C). U sledećem koraku, koristeći prethodno dobijene informacije i preklapanjem sekvenci dobijenih konstrukata primenom prvog i trećeg pristupa (Prilog 3D) sklopljena je celokupna sekvenca *SacI* klona iz konstrukta pALb35 poreklom sa plazmida pNJ1 soja BGNJ1-64 koja je deponovana u EMBL Gen-Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) pod pristupnim brojem (GenBank Accession No.) HG008907.2.

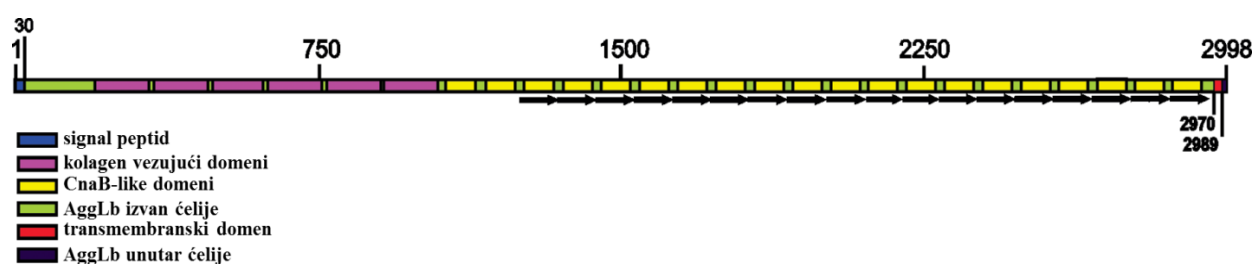
Na osnovu bioinformatičke analize sekvence utvrđeno je da konstrukt pALb35 sadrži *SacI* klonirani fragment veličine 11377, 42,28% G+C sastava i čine ga četiri ORF-a (*aggLb* gen okružen sa tri gena koji kodiraju traspozaze). Geni za traspozaze (dva uzvodno i jedan nizvodno u odnosu na *aggLb* gen) već su pronađeni u drugim sojevima roda *Lactobacillus* i pokazuju 100% identičnosti sa postojećim sekvencama u bazi podataka. Gen *aggLb*, odgovoran za sposobnost autoagregacije soja BGNJ1-64, sadrži 8994 bp u okviru konstrukta pALb35. Prvih 4523 bp *aggLb* gena (N-terminalni kraj proteina) deli 99% identičnosti sa genima koji kodiraju za nepoznati protein identifikovan u sojevima: *Lactobacillus casei* W56 (GenBank Accession No. HE970765), LC2W (GenBank Accession No. CP002617) i BDII (GenBank Accession No. CP002619). Preostali deo *aggLb* gena (4524–8994 bp) (C-terminalni kraj proteina) sadrži brojne ponovke koji ne pokazuju sličnost sa sekvencama dostupnim u bazi podataka. U genu su identifikovane dve velike ponovljene sekvence od 1196 bp (prva locirana između 3883–5078 nukleotida, a druga od 5293–6488) koje međusobno pokazuju 100% identičnost, ovaj region može dodatno biti podeljen na 18 potpuno identičnih ponovaka.

U cilju potvrde da ponovljene sekvence u okviru *aggLb* gena ne predstavljaju rezultat duplikacije u *E. coli* nastale tokom procesa genetičke manipulacije i propagacije, urađena je DNK-DNK hibridizacija (Southern blot) koristeći kao probu obeleženi konstrukt pALb35. Za hibridizaciju je korišćena plazmidna DNK soja BGNJ1-64 i konstrukt pALb35 izolovan iz *E. coli*, sečeni različitim restrikcionim enzimima (*SacI*, *XbaI*, *EcoRV*, *EcoRI*, *PstI* i *SphI*) (Prilog 4). Dobijeni rezultati, prisustvo signala odgovarajuće veličine (u zavisnosti od korišćenog restrikcionog enzima) u obe analizirane grupe (prirodni plasmid i klon) što predstavlja potvrdu da je veliki broj ponovljenih sekvenci u okviru *aggLb* gena prisutan na pNJ1 plazmidu prirodnog izolata BGNJ1-64.

#### 4.6. Domenska organizacija AggLb proteina

Analizom aminokiselinske sekvence utvrđeno je da je AggLb najveći agregacioni faktor laktobacila do sada opisan u literaturi, veličine 318,6 kDa, izuzetno bogat treoninom (12,5%) i lizinom (10,2%). Shematski prikaz domenske organizacije AggLb proteina dat je na Slici 10. Pomenuti protein sadrži dva različita tipa domena koji su u literaturi opisani kao veoma značajni za sposobnost adhezije: kolagen vezujući domeni na N-terminalnom kraju proteina (6 puta ponovljeni aminokiselinski ponovci locirani između 209–340, 361–496, 507–625, 635–757, 772–904 i 906–1047 aminokiseline) i kolagen vezujući protein B (CnaB-

like) domeni (K[ILV]ASGLTTDAKGQI[QK]VNDLKP[GS]DY YFVETAAPAGYELNDSKLNFTVELQ T) na C-terminalnom kraju proteina (20 puta ponovljeni aminokiselinski ponovci locirani između 1078–1144, 1178–1247, 1270–1340, 1364–1435, 1458–1529, 1552–1623, 1646–1717, 1740–1810, 1834–1905, 1928–1999, 2022–2093, 2116–2186, 2210–2280, 2304–2374, 2398–2468, 2492–2562, 2586–2656, 2680–2750, 2774–2844 i 2868–2932 aminokiseline). Na N-terminalnom kraju proteina nalazi se signal peptid koji se iseca između 30 i 31 aminokiseline na osnovu bioinformatičke predikcije (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen *et al.*, 2011). Na osnovu bioinformatičke analize AggLb protein poseduje domen za vezivanje za ćelijski zid (LPXTG) i jedan transmembranski domen na poziciji od 2970–2989 aminokiseline (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/CW-PRED/>) (Fimereli *et al.*, 2012). Dodatno, AggLb poseduje 18 skoro identičnih uzastopnih ponovaka na C-terminalnom kraju proteina, a svaki ponovak sadrži 94 aminokiseline (GSVVLNKTDSDTGKALSGAVFDLYKKDGTKIASGLM TDAKGQIKVNDLKP GDYYF VETAAPAGYELNDSKLNFTVELQTTAKVATVSATNAEKT) počevši od pozicije 1255 do 2946 aminokiseline bez razmaka između ponovaka (Slika 10, ponovci su prikazani crnim strelicama). Prvi i poslednji ponovak pokazuju veće međusobne razlike u aminokiselinskom sastavu.



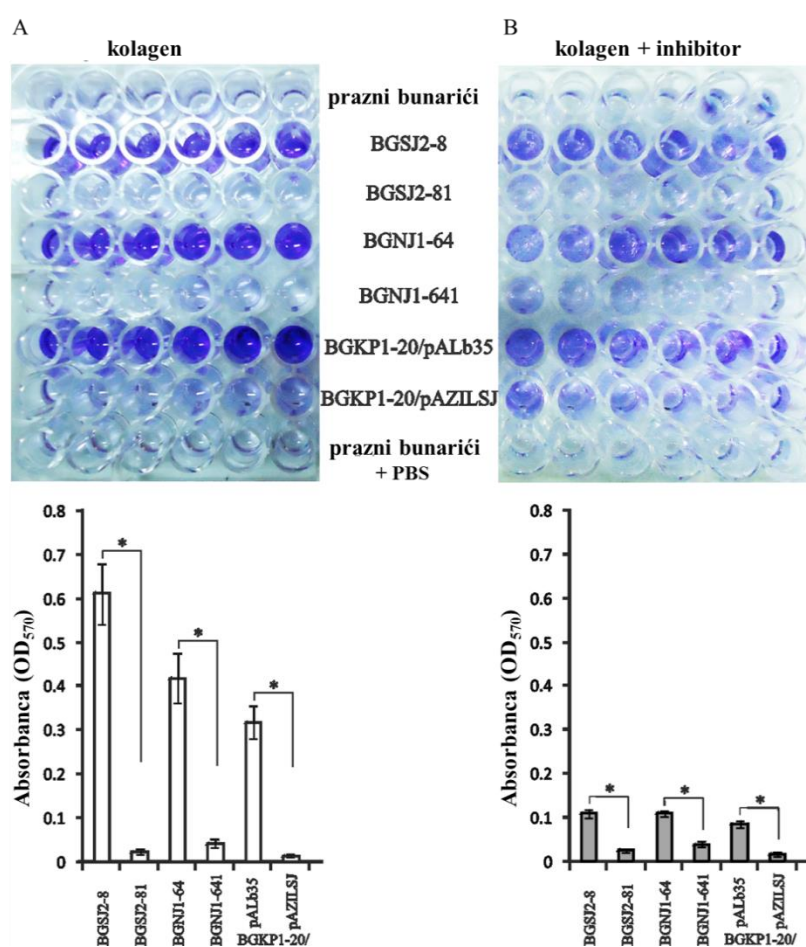
**Slika 10.** Shematski prikaz domenske organizacije AggLb proteina. Brojevi označavaju pozicije aminokiselina u okviru proteinske sekvence. Crne strelice prikazuju 18 skoro identičnih uzastopnih ponovaka na C-terminalnom kraju proteina.

#### 4.7. Funkcionalna karakterizacija AggLb proteina

U cilju razumevanja uloge, funkcije i stepena uticaja agregacionog faktora u probiotičkom potencijalu soja BGNJ1-64 urađeni su eksperimenti funkcionalne karakterizacije AggLb proteina.

#### 4.7.1. Sposobnost vezivanja analiziranih sojeva za imobilisani kolagen

Važan aspekt istraživanja u okviru ovog rada obuhvatao je izučavanje sposobnosti vezivanja eksprimiranog AggLb proteina na površini ćelija domaćina za imobilisani kolagen. Poređenjem stepena vezivanja analiziranih sojeva i derivata koji poseduju sposobnost agregacije (BGSJ2-8, BGNJ1-64 i BGKPI-20/pALb35) sa derivatima kod kojih je pomenuto svojstvo odsutno (BGSJ2-81, BGNJ1-641, BGKPI-20/pAZIL) potvrđen je doprinos eksprimiranog AggLb proteina na površini bakterijske ćelije u interakciji sa imobilisanim kolagenom (Slika 11A).

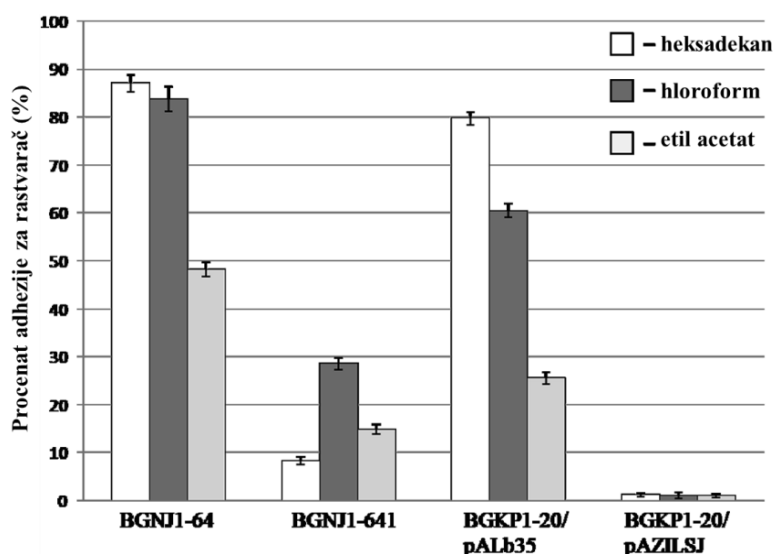


**Slika 11.** Analiza vezivanja i inhibicije vezivanja bakterija za imobilisani kolagen. (A) Vezivanje analiziranih sojeva i derivata koji imaju sposobnost agregacije (BGSJ2-8, BGNJ1-64 i BGKPI-20/pALb35) i derivata kod kojih je pomenuto svojstvo odsutno (BGSJ2-81, BGNJ1-641, BGKPI-20/pAZIL) za imobilisani kolagen na ploči (A, gore) i grafički prikaz rezultata (A, dole); (B) Inhibicija vezivanja analiziranih sojeva i derivata za imobilisani kolagen na ploči (B, gore) i grafički prikaz rezultata (B, dole). Prikazane su srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta sa standardnom devijacijom. Zvezdice pokazuju statistički značajnu razliku ( $p < 0,001$ ) između sojeva koji imaju sposobnost autoagregacije i njihovih derivata koji nemaju sposobnost autoagregacije.

Dodatno, u cilju testiranja specifičnosti vezivanja sojeva koji eksprimiraju AggLb protein za imobilisani kolagen, rađeni su eksperimenti inhibicije vezivanja bakterija za pomenuti matriks primenom heparina (natrijumova so) koji snažno inhibira vezivanje bakterijskih ćelija za komponente ECM-a. Bakterijske suspenzije pre dodavanja u obložene i pripremljene bunariće sa imobilisanim kolagenom, inkubirane su sa heparinom (natrijumova so) izolovanog iz mukoze svinjskog intestinuma. Dobijeni rezultati povrdili su specifičnost interakcije AggLb proteina i imobilisanog kolagena, s obzirom da nakon tretmana bakterijskih suspenzija heparinom nije došlo do interakcije površinskih bakterijskih molekula i imobilisanog kolagena (Slika 11B).

#### 4.7.2. Analiza uloge AggLb proteina u promeni površinskih osobina testiranih sojeva - adhezija za organske rastvarače

U cilju ispitivanja površinskih karakteristika analiziranih sojeva merena je hidrofobnost površine ćelija pri čemu je korišćen heksadekan kao nepolarni rastvarač, hloroform kao monopolarni, kiseli rastvarač i etil acetat kao monopolarni bazni rastvarač (Slika 12).



**Slika 12.** Analiza uloge AggLb proteina u promeni površinskih osobina testiranih sojeva. Rezultati su prikazani kao procenat adhezije za heksadekan, hloroform i etil acetat sojeva koji autoagregiraju (BGNJ1-64 i BGKP1-20pALb35) u odnosu na sojeve koji nemaju sposobnost autoagregacije (BGNJ1-641 i BGKP1-20/pAZILSJ).

Rezultati analize pokazuju da sojevi koji imaju sposobnost autoagregacije (BGNJ1-64 i BGKP1-20/pALb35) ispoljavaju visoki procenat adhezije za heksadekan (preko 75%) u

odnosu na Agg<sup>-</sup> sojeve (BGNJ1-641 i BGKP1-20/pAZIL) (manje od 10%) (Slika 12, beli stubići). Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da sojevi koji na površini ekspimiraju AggLb protein imaju izuzetno hidrofobnu površinu bakterijskih ćelija. Isti trend, primećen je i kada su korišćeni rastvarači hloroform i etil acetat (Slika 12, tamno i svetlo sivi stubići).

#### 4.7.3. Analiza uloge AggLb proteina u ekskluziji patogenih sojeva

Jedan od glavnih mehanizama kojim probiotički mikroorganizmi ostvaruju pozitivan efekat na zdravlje ljudi je kompeticija sa patogenim sojevima za adheziona mesta u organizmu. U ovom radu, praćena je sposobnost sojeva i derivata koji na površini ekspimiraju agregacioni faktor laktobacila u ekskluziji analiziranih patogenih sojeva (*S. aureus* i *E. coli* H7:O157) u *in vitro* uslovima. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 5.

**Tabela 5.** Analiza uloge AggLb proteina u ekskluziji *S. aureus* i *E. coli* H7:O157.

Ekperimentalna postavka	Broj vezanih ćelija <i>S. aureus</i> (CFU/well)	Broj vezanih ćelije <i>E. coli</i> H7:O157 (CFU/well)
Imobilisani kolagen (kontrola)	466 ± 23,43	420,6 ± 19,36
Imobilisani kolagen obložen sa:		
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>		
BGSJ2-8 <sup>+</sup>	47,33 ± 5,51	68,4 ± 6,69
BGSJ2-81 <sup>-</sup>	314,0 ± 15,10	361,8 ± 16,79
BGNJ1-64 <sup>+</sup>	41,0 ± 4,58	34,4 ± 5,03
BGNJ1-641 <sup>-</sup>	417,66 ± 25,38	267,4 ± 18,51
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		
BGKP1 <sup>+</sup>	68,0 ± 6,24	38,0 ± 7,31
BGKP1-20 <sup>-</sup>	337,33 ± 17,0	275,0 ± 20,31
BGKP1-20/pALb35 <sup>+</sup>	44,33 ± 7,23	35,2 ± 4,15

<sup>+</sup> - soj poseduje sposobnost autoagregacije, <sup>-</sup> - soj ne poseduje sposobnost autoagregacije.

Sojevi i derivati uključeni u eksperiment ekskluzije patogena koji poseduju sposobnost agregacije (BGSJ2-8, BGNJ1-64, BGKP1, BGKP1-20/pALb35) su u prethodno pomenutim eksperimentima pokazali jak afinitet vezivanja za imobilisani kolagen. Takođe, patogeni sojevi korišćeni u ovom eksperimentu, *S. aureus* ATCC25923 i *E. coli* O157:H7, pokazuju visok stepen vezivanja za isti matriks (466 ± 23,43; 420,6 ± 19,36 CFU/bunarić, redom). Kada je imobilisani kolagen, pre dodavanja testiranih patogenih sojeva, prethodno inkubiran sa analiziranim sojevima koji imaju sposobnost agregacije (Agg<sup>+</sup>), primećeno je znatno smanjenje stepena vezivanja patogenih sojeva za pomenuti matriks. Značajna razlika u inhibiciji adhezije za imobilisani kolagen soja *S. aureus* ATCC25923 (80,83%) i *E. coli*



O157:H7 (55,39%) primećena je poređenjem efekta soja BGNJ1-64 i njegovog Agg<sup>-</sup> derivata BGNJ1-641. Slično, razlika između soja BGSJ2-8 i njegovog Agg<sup>-</sup> derivata BGSJ2-81 je 57,22% (*S. aureus* ATCC25923) i 69,75% (*E. coli* O157:H7).

Da bismo potvrdili samostalni doprinos *aggLb* gena u procesu ekskluzije patogenih sojeva *S. aureus* ATCC25923 i *E. coli* O157:H7 uključen je i derivat BGKP1-20/pALb35 koji je poređen sa odgovarajućim kontrolnim derivatom (BGKP1-20/pAZILSJ). Vezivanje *S. aureus* ATCC25923 smanjeno je sa  $337,33 \pm 17,0$  CFU/bunarić (obloženo sa BGKP1-20/pAZILSJ) na  $68,0 \pm 6,24$  i  $44,33 \pm 7,23$  CFU/bunarić (obloženo sa BGKP1 i BGKP1-20/pALb35, redom). Slično, vezivanje *E. coli* O157:H7 za kolagen smanjeno je sa  $275,0 \pm 20,31$  CFU/bunarić (obloženo sa BGKP1-20/pAZILSJ) na  $38,0 \pm 7,31$  i  $35,2 \pm 4,15$  CFU/bunarić (obložen sa BGKP1 i BGKP1-20/pALb35, redom).

Sposobnosti soja BGKP1 (nosi *aggL* gen) da inhibira adheziju *S. aureus* ATCC25923 za imobilisani kolagen je 57,79% i *E. coli* O157:H7 za isti matriks je 56,35%, dok sposobnost soja BGKP1-20/pALb35 (nosi *aggLb* gene) da inhibira adheziju *S. aureus* ATCC25923 za imobilisani kolagen je 62,87% i *E. coli* O157:H7 za isti matriks je 57,01%.

Sveobuhvatno, dobijeni rezultati pokazuju da AggLb protein kao i AggL ima ulogu u inhibiciji vezivanja testiranih patogenih sojeva za imobilisani kolagen.

#### 4.7.4. Analiza uloge AggLb proteina u koagregaciji patogenih sojeva

Fenomen koagregacije kod laktobacila veoma je važan sa aspekta njihove primene s obzirom da je sposobnost laktobacila da koagregiraju sa patogenim bakterijama u GI i UG traktu jedan od mogućih mehanizama kojima organizam čoveka štite od bakterijske infekcije. U cilju sagledavanja uticaja AggLb proteina na sposobnost koagregacije, analizirana je sposobnost formiranja koagregata sojeva BGNJ1-64 i BGKP1-20/pALb35 sa patogenim sojevima *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 i *L. innocua* ATCC33090, pri čemu su u ekperiment bili uključeni i kontrolni Agg<sup>-</sup> derivati BGNJ1-641 i BGKP1-20/pAZILSJ.

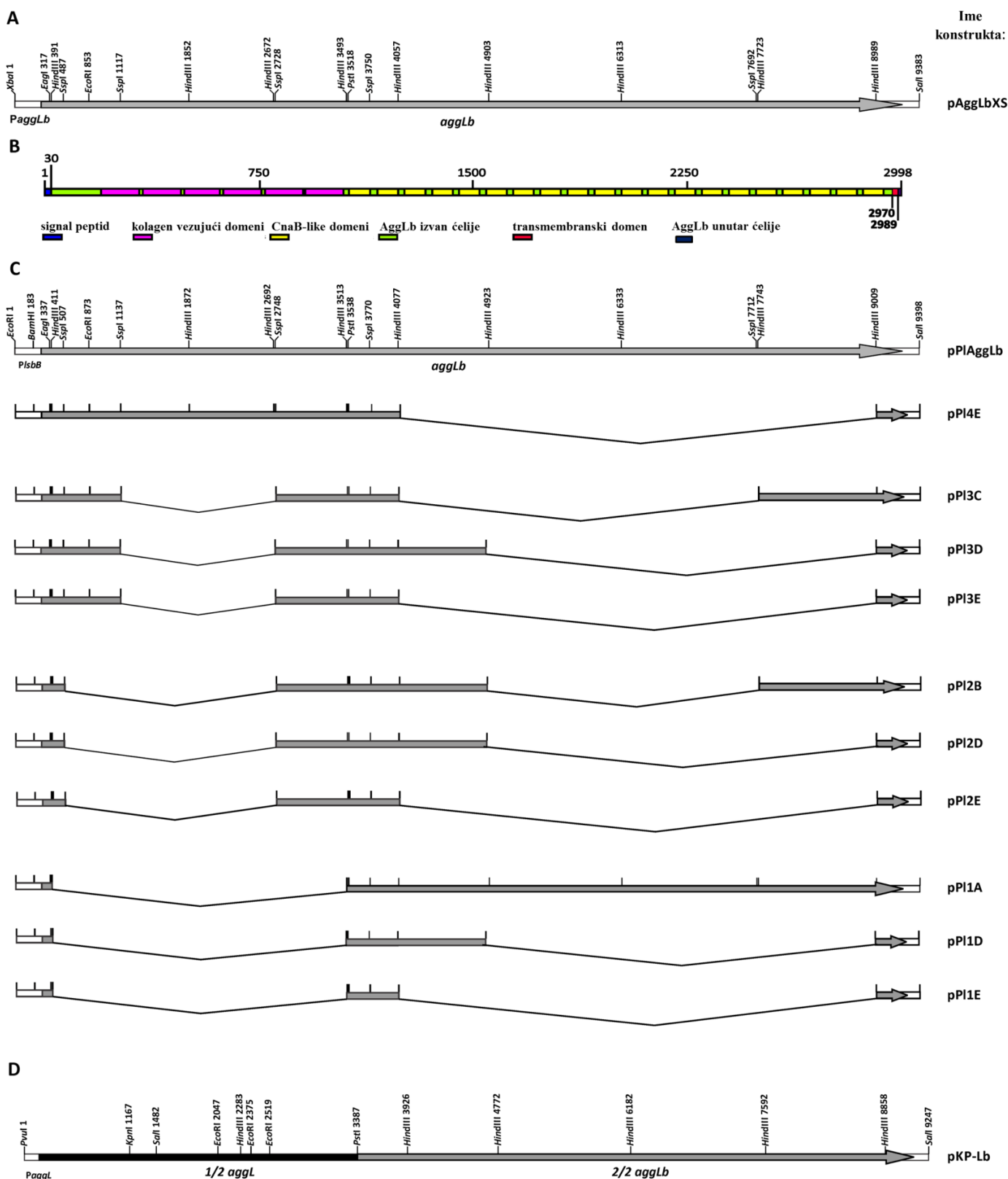
Dobijeni rezultati ukazivali su na odsustvo fenomena koagregacije, odnosno direktne interakcije sojeva BGNJ1-64 i BGKP1-20/pALb35 sa analiziranim patogenim sojevima.

#### 4.7.5. Varijante AggLb proteina i njihova heterologa ekspresija

Nakon detaljne analize domenske organizacije AggLb proteina i dizajniranja studije u cilju konstrukcije varijanti AggLb proteina sa različitim brojem kolagen vezujućih i CnaB-like domena, uspešno je završena konstrukcija većine planiranih konstrukata, dok pojedine planirane varijante AggLb proteina nije bilo moguće uspešno konstruisati ni nakon višestrukih pokušaja kloniranja.

Postojanjem *PstI* restrikcionog mesta u okviru *aggLb* gena znatno je olakšano dizajniranje strategije konstrukcije varijanti AggLb proteina, s obzirom da *PstI* restrikcioni enzim deli AggLb protein tačno na dva dela: prvi deo sadrži lider peptid i šest kolagen vezujućih domena, a drugi deo sadrži 20 CnaB-like domena i domen za ukotvljavanje (Slika 13 A i B). Subkloniranjem, je *aggLb* gen uspešno podeljen na dva regiona pri čemu su dobijeni konstrukti u pBlueScript vektoru: pBS-XP koji nosi *XbaI-PstI* fragment i pBS-PS koji nosi *PstI-SalI* fragment (Tabela 1; Prilog 5B). S obzirom da je AggLb izuzetno veliki protein manipulacije u konstrukciji varijanti su bile bazirane na pogodnoj poziciji *HindIII* i *SspI* restrikcionih mesta u okviru konstrukta pBS-XP i na pogodnoj poziciji *HindIII* restrikcionih mesta u okviru konstrukta pBS-PS. Ovako uzak izbor pogodnih restrikcionih mesta koja su se mogla koristiti za dalji rad, posledica je činjenice da pri deleciji *HindIII* ili *SspI* restrikcionih fragmenata mora doći do fuzionisanja delova proteina u fazi čitanja. Nakon parcijalne digestije konstrukata pBS-XP i pBS-PS *HindIII* restrikcionim enzimom, ligacije, transformacije i analize transformanata, dobijeni su sledeći konstrukti koji su korišćeni u daljem radu: pBS-XP-1, pBS-XP-4, pBS-PS-A, pBS-PS-B, pBS-PS-C, pBS-PS-D i pBS-PS-E (Tabela 1; Prilog 5 B i D). Nakon parcijalne digestije konstrukta pCR-XP (konstrukt dobijen kloniranjem *XbaI-PstI* fragmenta iz konstrukta pBS-XP u pCR2.1-TOPO vektor, videti Materijal i metode) *SspI* restrikcionim enzimom, ligacije, transformacije i analize transformanata dobijeni su sledeći konstrukti koji su korišćeni u daljem radu: pCR-XP-2 i pCR-XP-3 (Prilog 5C). Sumirano, parcijalnom digestijom konstrukata pBS-XP i pBS-PS *HindIII* restrikcionim enzimom i konstrukta pCR-XP *SspI* restrikcionim enzimom, dobijeni su konstrukti koji nose različite varijante prvog dela *aggLb* gena (pBS-XP-1, pBS-XP-4, pCR-XP-2 i pCR-XP-3) i konstrukti koji nose različite varijante drugog dela *aggLb* gena (pBS-PS-A, pBS-PS-B, pBS-PS-C, pBS-PS-D i pBS-PS-E). Kombinacijom, dobijeni su hibridni konstrukti (pBS-PI4E; pBS-PI3C; pBS-PI3D; pBS-PI3E; pBS-PI2B; pBS-PI2D; pBS-PI2E; pBS-PI1A; pBS-PI1D; pBS-PI1E) koji nose različite varijante prvog i drugog dela *aggLb*

gena (Tabela 1). Sve dobijene kombinacije varijanti *aggLb* gena klonirane su ispred laktokokalnog PlsbB promotora, nakon čega su dobijeni finalni konstrukti (pAZIL-pPI4E, pAZIL-pPI3C, pAZIL-pPI3D, pAZIL-pPI3E, pAZIL-pPI2B, pAZIL-pPI2D, pAZIL-pPI2E, pAZIL-pPI1A, pAZIL-pPI1D i pAZIL-pPI1E) (Tabela 1) kod kojih je obezbeđena uniformna ekspresija svih AggLb varijanti. U cilju posedovanja relevantne kontrole u daljim eksperimentima, konstruisan je konstrukt pAZIL-pPIAggLb koji sadrži intaktan *aggLb* gen kloniran ispred laktokokalnog PlsbB promotora. Dodatno, konstruisan je hibridni konstrukt pAZIL-pKP-Lb koji nosi prvi deo AggL laktokokalnog proteina i drugi deo AggLb laktobacilusnog proteina (Slika 13D; Tabela 1).



**Slika 13.** Shematski prikaz (A) *aggLb*; (B) domenske organizacije AggLb proteina; (C) uspešno konstruisanih varijanti AggLb proteina sa različitim brojem kolagen vezujućih i CnaB domena, pod ekspresijom promotora PlsbB; (D) konstrukcija hibridnog pKP-Lb konstrukta.

U Tabeli 6 prikazan je broj kolagen vezujućih i CnaB-like motiva kod uspešno konstruisanih varijanti AggLb proteina. U ovoj studiji raspolagali smo konstruktima koji u različitim kombinacijama sadrže: kolagen vezujuće domene (6, 2 (hibridi I-V i VI domen), 1+1/2 (1/2 V i VI domen) ili 0 (bez domena)) i CnaB-like domene (20, 10, 7, 5 ili 2). Ovakav dijapazon varijanti AggLb proteina (od najvećeg 318,6 kDa do najmanjeg 34,2 kDa), omogućava sagledavanje doprinosa pojedinačnih domena u okviru AggLb proteina eksprimiranih na površini ćelija domaćina u ostvarivanju njihove uloge u uslovima u kojima probiotici treba da ostvare svoju aktivnost.

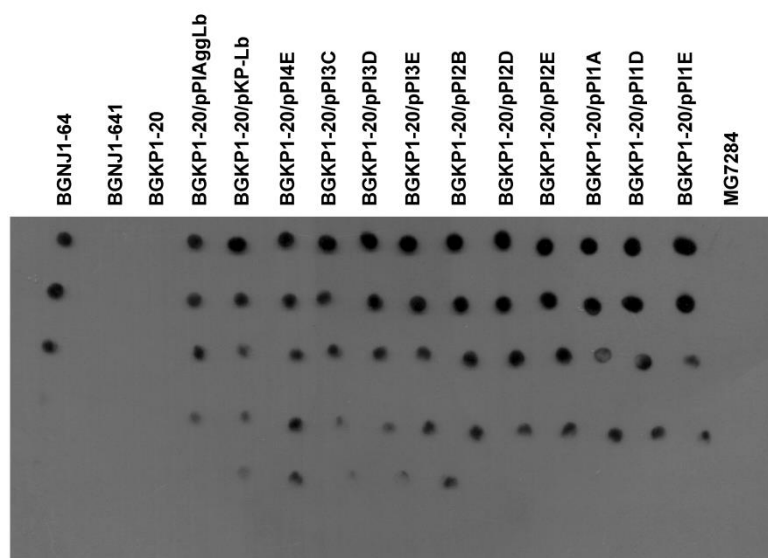
**Tabela 6.** Domenska organizacija varijanti AggLb koje sadrže različite brojeve kolagen vezujućih i CnaB-like domena.

Ime konstrukta	Broj kolagen vezujućih domena	Broj CnaB-like domena	Molekulska masa eksprimiranog proteina (kDa)
pAZIL-pPIAggLb	6	20	318,6
pAZIL-pPI4E	6	2	145,5
pAZIL-pPI3C	2	7	132,0
	(hibrid I-V i VI)		
pAZIL-pPI3D	2	5	117,3
	(hibrid I-V i VI)		
pAZIL-pPI3E	2	2	87,6
	(hibrid I-V i VI)		
pAZIL-pPI2B	1+1/2	10	139,3
	(1/2V i VI)		
pAZIL-pPI2D	1+1/2	5	94,8
	(1/2V i VI)		
pAZIL-pPI2E	1+1/2	2	65,0
	(1/2V i VI)		
pAZIL-pPI1A	0	20	207,3
pAZIL-pPI1D	0	5	63,9
pAZIL-pPI1E	0	2	34,2

Svi konstrukti koji nose različite varijane *aggLb* gena (pAZIL-pPIAggLb, pAZIL-pPI4E, pAZIL-pPI3C, pAZIL-pPI3D, pAZIL-pPI3E, pAZIL-pPI2B, pAZIL-pPI2D, pAZIL-pPI2E, pAZIL-pPI1A, pAZIL-pPI1D i pAZIL-pPI1E), kao i hibridni konstrukt pAZIL-pKP-Lb, su eksprimirani u heterologom domaćinu BGKP1-20 (Agg<sup>-</sup>).

#### 4.7.5.1. Potvrda ekspresije svih varijanti AggLb proteina na površini bakterijskih ćelija

U cilju potvrde ekspresije AggLb varijanti na površini derivata koji ih eksprimiraju (BGKP1-20/pPIAggLb, BGKP1-20/pKP-Lb, BGKP1-20/pPI4E, BGKP1-20/pPI3C, BGKP1-20/pPI3D, BGKP1-20/pPI3E, BGKP1-20/pPI2B, BGKP1-20/pPI2D, BGKP1-20/pPI2E, BGKP1-20/pPI1A, BGKP1-20/pPI1D i BGKP1-20/pPI1E) urađena je Dot-blot analiza, koristeći antitela na AggLb (AggLb-Ab) proizvedena u mišu (Slika 14).



**Slika 14.** Dot-blot analiza u cilju potvrde ekspresije svih varijanti AggLb na površini ćelija domaćina (*L. lactis* subsp. *lactis* BGKP1-20) korišćenjem AggLb-Ab.

Prethodno ujednačene količine totalnih proteina svih analiziranih derivata kao i odgovarajućih kontrola (Prilog 6), nanete su na membranu. Na osnovu Dot-blot analize, pokazano je da svi analizirani derivati BGKP1-20/pPIAggLb, BGKP1-20/pKP-Lb, BGKP1-20/pPI4E, BGKP1-20/pPI3C, BGKP1-20/pPI3D, BGKP1-20/pPI3E, BGKP1-20/pPI2B, BGKP1-20/pPI2D, BGKP1-20/pPI2E, BGKP1-20/pPI1A, BGKP1-20/pPI1D i BGKP1-20/pPI1E na površini eksprimiraju određene varijante AggLb proteina. Detekcija signala u analiziranim uzorcima totalnih proteina svih derivata koji na površini eksprimiraju varijante AggLb proteina, posledica je prisustva varijanti AggLb proteina (čime je prethodila njihova ekspresija na površini ćelija domaćina) u uzorcima i njihove specifične interakcije sa korišćenim antitelom. Odgovarajući signal prisutan je i u pozitivnoj kontroli (BGNJ1-64) što ukazuje na specifičnost korišćenog antitela (AggLb-Ab). Kod negativnih kontrola (BGNJ1-641, BGKP1-20 i MG7284) signal nije detektabilan.

#### 4.7.6. Funkcionalna karakterizacija varijanti AggLb proteina

Set eksperimenata obuhvaćen ovom celinom podrazumeva manipulaciju derivatima koji na površini ćelije ekspimiraju agregacioni faktor sa različitim brojem kolagen vezujućih i CnaB-like motiva, primenom sledećih metodoloških pristupa: izračunavanje stepena autoagregacije, određivanje stepena vezivanja za molekule prisutne u GI traktu čoveka (kolagen i fibronektin) i formiranje biofilma.

##### 4.7.6.1. Step autoagregacije varijanti AggLb ekspimiranih na površini bakterijskih ćelija

Na osnovu merenja OD<sub>600</sub> kao i vizuelnom metodom moglo se uočiti da različite varijante ekspimiranog AggLb proteina na površini ćelija različito utiču na sposobnost ćelija domaćina da agregiraju (Tabela 7).

**Tabela 7.** Autoagregacija derivata koji na površini ekspimiraju varijante AggLb proteina kao i odgovarajućih kontrolnih sojeva, praćena tokom 5 h. Prikazane su prosečne vrednosti tri nezavisna eksperimenta sa standardnom devijacijom.

Soj/derivat	% autoagregacije				
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
BGNJ1-64	43,0±1,36	49,5±1,82	55,3±0,69	59,4±1,74	63,5±0,98
BGNJ1-641	15,9±0,55	19,7±0,79	21,3±1,24	23,1±1,41	26,4±0,67
BGKP1	39,4±1,43	46,8±2,02	51,7±1,78	56,3±2,13	61,8±1,14
BGKP1-20	1,3±0,06	1,8±0,11	2,2±0,08	3,5±0,10	4,2±0,07
BGKP1-20/pPIAggLb	30,5±2,01	37,6±1,34	43,1±2,38	48,6±0,85	54,9±1,22
BGKP1-20/pKP-Lb	1,5±0,10	3,1±0,09	3,6±0,07	4,4±0,13	4,9±0,08
BGKP1-20/pPI4E	33,8±1,14	44,1±2,64	48,3±2,24	55,6±1,89	62,1±2,20
BGKP1-20/pPI3C	1,5±0,13	2,8±0,07	3,5±0,11	4,6±0,17	5,4±0,15
BGKP1-20/pPI3D	1,4±0,05	3,3±0,19	4,1±0,27	5,1±0,04	5,8±0,08
BGKP1-20/pPI3E	1,6±0,09	3,1±0,06	3,5±0,17	4,7±0,08	6,6±0,19
BGKP1-20/pPI2B	1,4±0,05	3,0±0,08	3,5±0,09	5,2±0,24	6,2±0,06
BGKP1-20/pPI2D	1,8±0,07	2,6±0,16	3,6±0,05	4,7±0,16	5,4±0,14
BGKP1-20/pPI2E	1,2±0,12	2,7±0,18	4,0±0,06	5,2±0,05	6,1±0,07
BGKP1-20/pPI1A	1,6±0,06	2,8±0,09	4,1±0,10	5,1±0,24	6,0±0,09
BGKP1-20/pPI1D	1,3±0,08	2,7±0,07	4,4±0,14	5,2±0,09	6,1±0,12
BGKP1-20/pPI1E	0,9±0,07	2,5±0,20	3,6±0,05	4,4±0,15	5,3±0,05

AggLb na N-terminusu poseduje šest heterogenih kolagen vezujućih domena koji pokazuju veoma nisku homologiju i pokazuju različit doprinos u autoagregaciji ćelija. Varijanta AggLb proteina koja na N-terminusu poseduje svih šest kolagen vezujućih domena, derivat BGKP1-20/pPI4E, ima sposobnost da indukuje autoagregaciju po intenzitetu približnu onoj koju može da ostvari neizmenjen AggLb protein (BGKP1-20/pPIAggLb) ili divlji soj (BGNJ1-64). Interesantno je naglasiti da nije uočena linearna zavisnost između broja kolagen vezujućih domena i nivoa autoagregacije ukazujući da doprinos pojedinačnih kolagen vezujućih domena nije podjednak. Varijante AggLb koje su imale deletirane kolagen vezujuće domene II, III i IV nisu pokazivale sposobnost agregacije ukazujući da su ova tri domena izuzetno bitna za funkciju AggLb proteina kao agregacionog faktora.

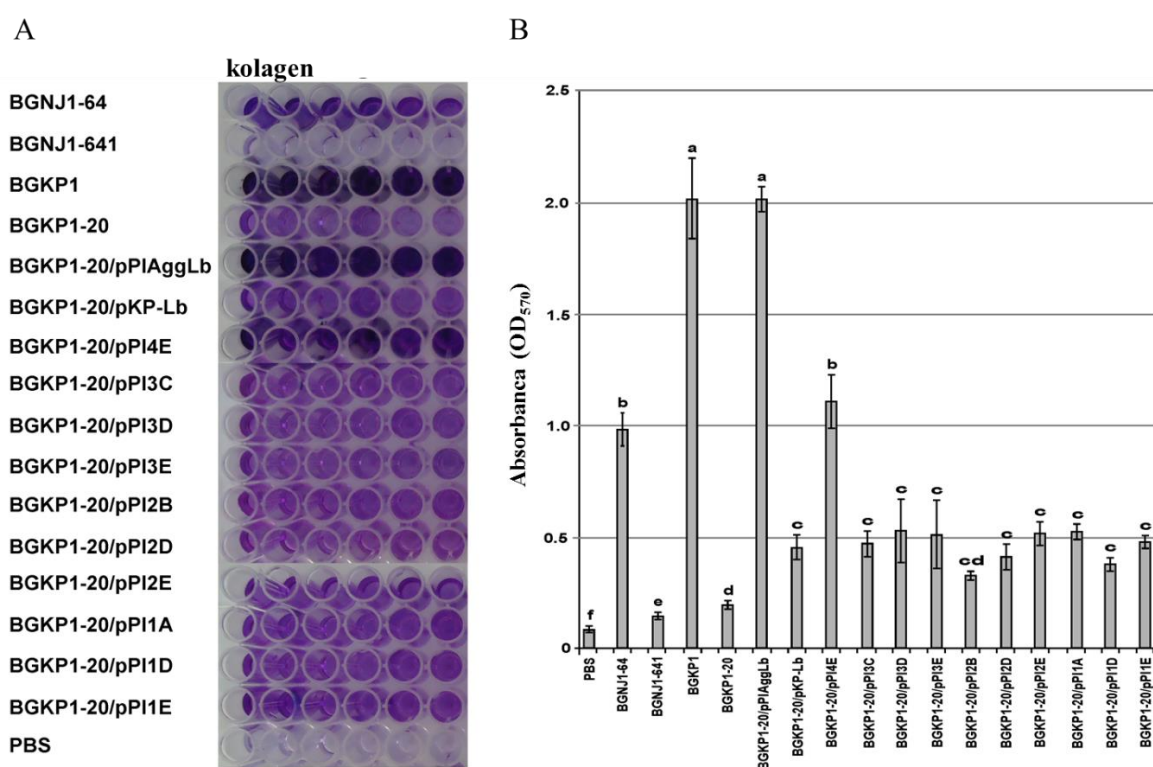
Za razliku od N-terminusa, C-terminus AggLb proteina se sastoji od 20 skoro 100% identičnih CnaB-like vezujućih domena. Derivat BGKP1-20/pPI4E koji eksprimira AggLb protein kome nedostaje čak 18 CnaB-like vezujućih domena je ispoljio približno isti nivo agregacije kao i polazni soj (BGNJ1-64). Dodatno, drugi derivati koji ekspimiraju varijante AggLb proteina koje poseduju 2 (hibridi I-V i VI domen), 1+1/2 (1/2 V i VI domen) ili 0 (bez domena) kolagen vezujućih domena i samo po 2 CnaB-like vezujuća domena (BGKP1-20/pPI3E, BGKP1-20/pPI2E i BGKP1-20/pPI1E, redom) pokazuju približno isti nivo agregacije kao i derivati koji na svojoj površini ekspimiraju varijante AggLb proteina koje sadrže 5 (BGKP1-20/pPI3D, BGKP1-20/pPI2D, BGKP1-20/pPI1D), 7 (BGKP1-20/pPI3C), 10 (BGKP1-20/pPI2B) ili 20 (BGKP1-20/pPI1A) CnaB-like domena. Zaključak koji proizilazi iz ovih rezultata ukazuje na to da CnaB-like domeni najverovatnije nemaju direktnu ulogu u agregaciji ćelija.

#### **4.7.6.2. Stepen vezivanja za imobilisani kolagen varijanti AggLb ekspimiranih na površini bakterijskih ćelija**

Važan aspekt funkcionalne karakterizacije varijanti AggLb proteina ekspimiranih na površini ćelija domaćina obuhvatao je analizu njihove sposobnosti vezivanja za imobilisani kolagen. Soj BGKP1-20 je korišćen kao negativna kontrola vezivanja za pomenuti matriks, u odnosu na koju je analiziran stepen vezivanja svih testiranih derivata, s obzirom da su sve varijante AggLb proteina ekspimirane na površini ćelija domaćina BGKP1-20. Zanimljivo, duplo veći stepen adherentnosti za imobilisani kolagen se zapaža kod derivata BGKP1-20/pPIAggLb koji na površini eksprimira intaktan *aggLb* gen u odnosu na divlji soj BGNJ1-64 i približno isti nivo vezivanja u odnosu na laktokokalni soj BGKP1 koji poseduje



sposobnost agregacije. Prvenstveno je uočeno da se derivat koji poseduje svih šest kolagen vezujućih domena (BGKP1-20/pPI4E) sa sličnim, visokim, afinitetom vezuje za imobilisani kolagen kao i soj BGNJ1-64. Poređenjem međusobnog stepena vezivanja ostalih analiziranih derivata koji na površini eksprimiraju različite varijane AggLb proteina (BGKP1-20/pPI3C, BGKP1-20/pPI3D, BGKP1-20/pPI3E, BGKP1-20/pPI2D, BGKP1-20/pPI2E, BGKP1-20/pPI1A, BGKP1-20/pPI1D, BGKP1-20/pPI1E i BGKP1-20/pKP-Lb) uočeno je da poseduju približno sličan stepen vezivanja za imobilisani kolagen, dok je najmanji stepen adherentnosti za pomenuti matriks zapažen kod derivata BGKP1-20/pPI2B (Slika 15).

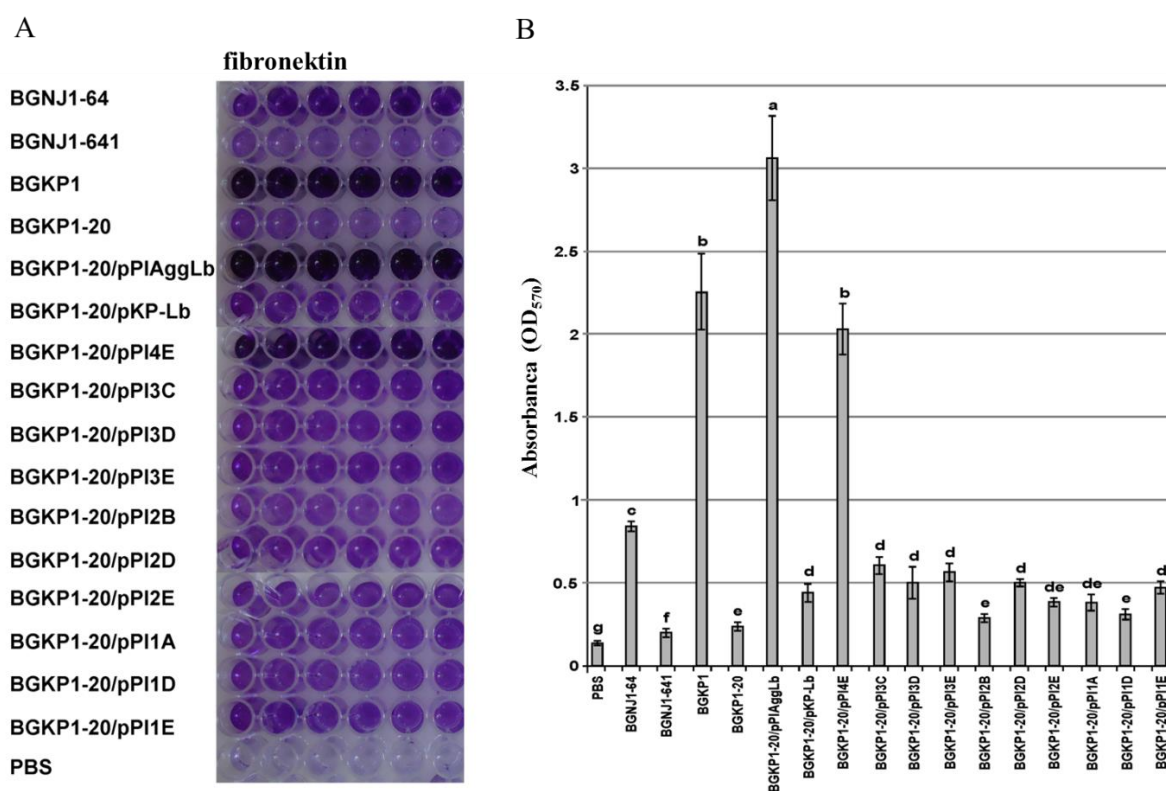


**Slika 15.** Analiza vezivanja za imobilisani kolagen. Vezivanje testiranih derivata koji na površini eksprimiraju varijante AggLb proteina (uključujući odgovarajuće kontrole) za imobilisani kolagen (A) na ploči i (B) grafički prikaz rezultata. Prikazane su srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta sa standardnom devijacijom. Svaki stubić koji ne deli isto slovo je statistički međusobno različit ( $p < 0,001$ ).

Poređenjem stepena vezivanja analiziranih sojeva i derivata koji poseduju sposobnost agregacije (BGNJ1-64 i BGKP1) sa derivatima kod kojih je pomenuto svojstvo odsutno (BGNJ1-641 i BGKP1-20) još jednom je potvrđen doprinos prisutnog AggLb proteina na površini bakterijske ćelije u interakciji sa imobilisanim kolagenom.

#### 4.7.6.3. Stepen vezivanja za imobilisani fibronektin varijanti AggLb proteina eksprimiranih na površini bakterijskih ćelija

S obzirom da je fibronektin, pored kolagena, druga veoma zastupljena komponenta ECM-a, u ovom radu testirana je sposobnost vezivanja za imobilisani fibronektin svih derivata koji na površini eksprimiraju varijante AggLb proteina (Slika 16). Primećen je veoma sličan trend vezivanja svih analiziranih derivata koji na površini eksprimiraju različite varijante AggLb proteina za imobilisani fibronektin kao i za imobilisani kolagen na ploči.



**Slika 16.** Analiza vezivanja za imobilisani fibronektin. Vezivanje testiranih derivata koji na površini eksprimiraju varijante AggLb proteina (uključujući odgovarajuće kontrole) za imobilisani fibronektin (A) na ploči i (B) grafički prikaz rezultata. Prikazane su srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta sa standardnom devijacijom. Svaki stubić koji ne deli isto slovo je statistički međusobno različit ( $p < 0,001$ ).

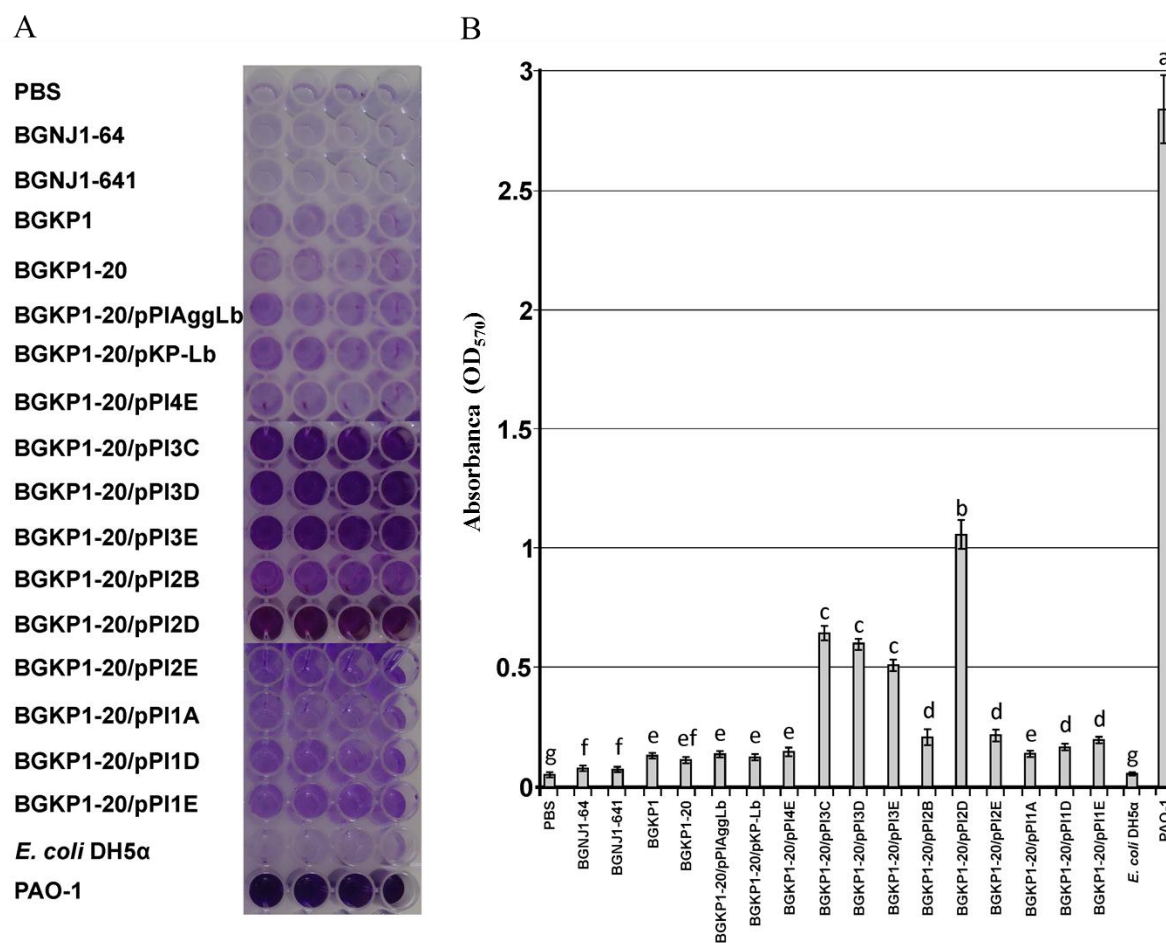
Najveći stepen adherentnosti poseduje derivat BGKP1-20/pPI4E, dok vezivanje za imobilisani fibronektin nije zapaženo kod derivata BGKP1-20/pPI2B i BGKP1-20/pPI1D (Slika 16B). Poređenjem stepena vezivanja soja BGKP1-20 (negativna kontrola vezivanja) i ostalih analiziranih derivata koji na površini eksprimiraju različite varijane AggLb proteina (BGKP1-20/pPI3C, BGKP1-20/pPI3D, BGKP1-20/pPI3E, BGKP1-20/pPI2D, BGKP1-

20/pPI2E, BGKP1-20/pPI1A, BGKP1-20/pPI1E i BGKP1-20/pKP-Lb) pokazano je da svi derivati poseduju neznatno viši stepen vezivanja za imobilisani fibronektin (Slika 16).

Kao i u prethodnom eksperimentu vezivanja za imobilisani kolagen, i u slučaju vezivanja za imobilisani fibronektin potvrđen je doprinos eksprimiranog AggLb proteina na površini bakterijske ćelije u interakciji sa ovim matriksom, poređenjem stepena vezivanja analiziranih sojeva i derivata koji poseduju sposobnost agregacije (BGNJ1-64 i BGKP1) sa derivatima kod kojih je pomenuto svojstvo odsutno (BGNJ1-64 i BGKP1-20).

#### **4.7.6.4. Sposobnost formiranja biofilma kod derivata koji eksprimiraju različite varijante AggLb proteina na površini bakterijskih ćelija**

Na osnovu sposobnosti formiranja biofilma, odnosno afiniteta vezivanja za plastiku, analizirani derivati koji na površini eksprimiraju različite varijante AggLb proteina mogu se podeliti u nekoliko grupa. Prvu grupu čini derivat BGKP1-20/pPI2D [poseduje 1+1/2 (1/2 V i VI)] kolagen vezujućih domena i 5 CnaB-like vezujućih domena) koji pokazuje najviši stepen sposobnosti formiranja biofilma, drugu grupu čine sojevi BGKP1-20/pPI3C, BGKP1-20/pPI3D i BGKP1-20/pPI3E sa približno upola manjom sposobnošću formiranja biofilma u odnosu na BGKP1-20/pPI2D, treću grupu čine sojevi BGKP1-20/pPI2B, BGKP1-20/pPI2E, BGKP1-20/pPI1D i BGKP1-20/pPI1E koji se karakterišu još manjom adherentnošću za plastiku, dok ostali testirani derivati pokazuju isti ili neznatno viši stepen formiranja biofilma u odnosu na kontrolni soj BGKP1-20 (Slika 17).



**Slika 17.** Analiza formiranja biofilma. Vezivanje testiranih derivata koji na površini eksprimiraju varijante AggLb proteina (uključujući odgovarajuće kontrole) za plastiku (A) na ploči i (B) grafički prikaz rezultata. Prikazane su srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta sa standardnom devijacijom. Svaki stubić koji ne deli isto slovo je statistički međusobno različit ( $p < 0,05$ ).

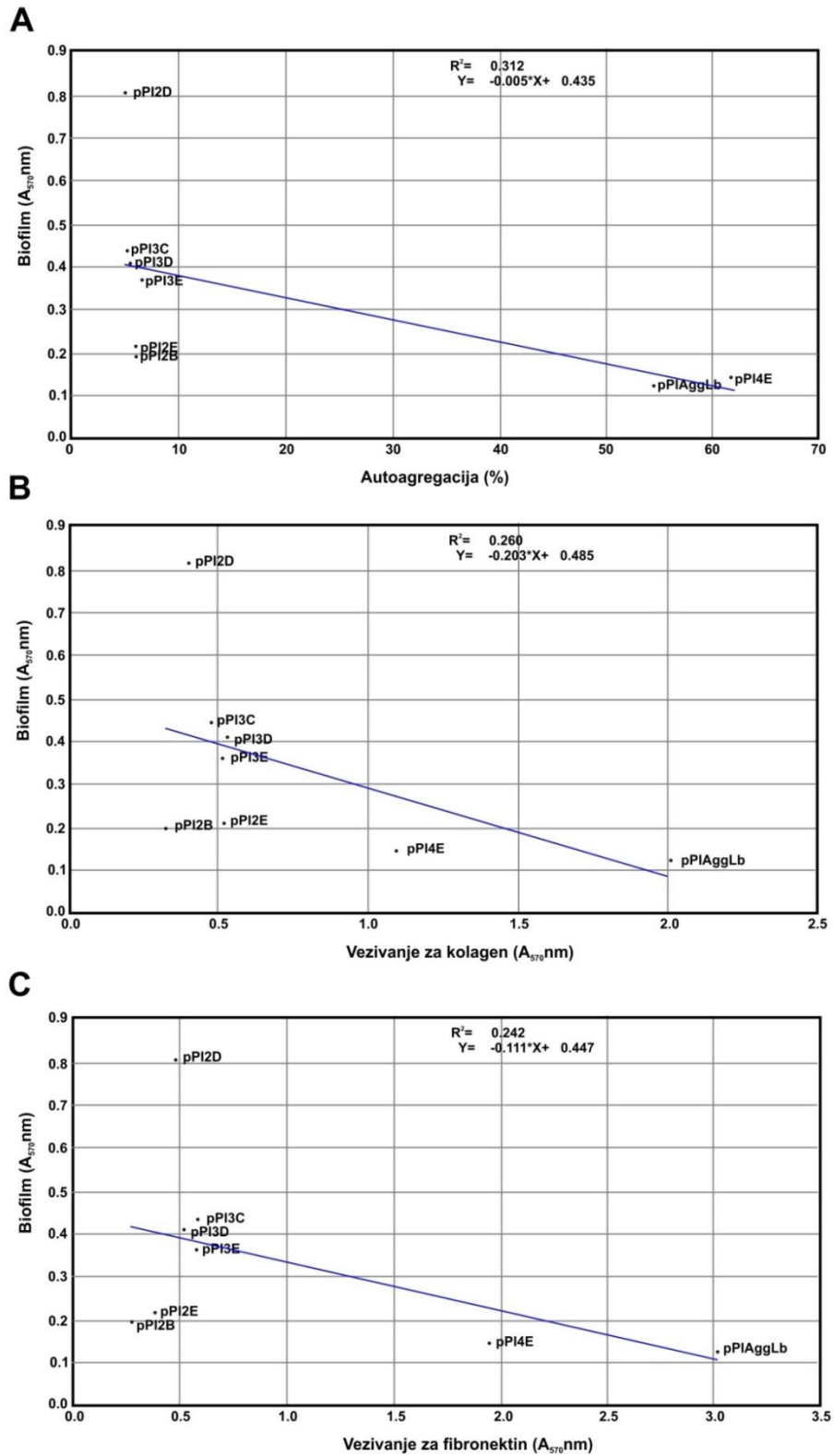
U ovom ekperimentu kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P. aeruginosa* PAO1, a kao negativne kontrole soj *E. coli* DH5 $\alpha$ , kao i PBS pufer u kojem su bili resuspendovani svi testirani sojevi i derivati.

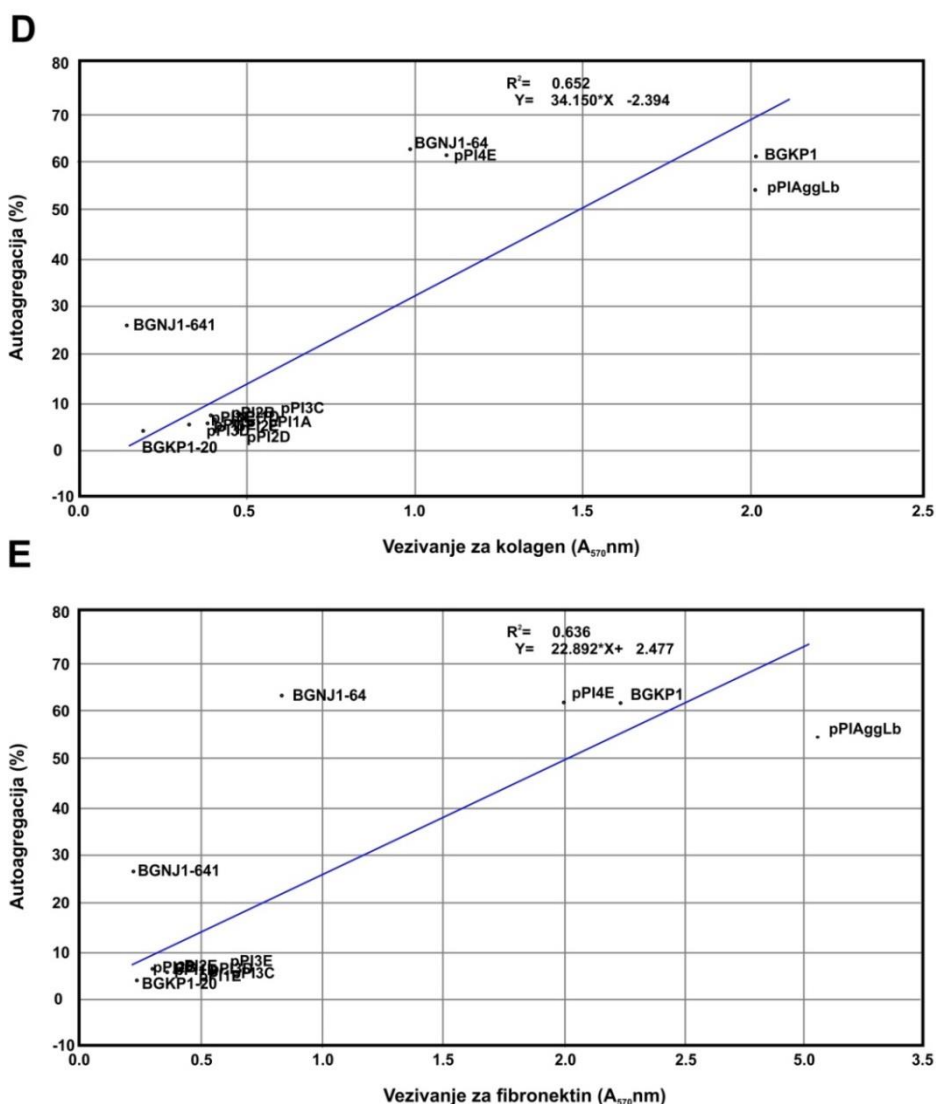
#### 4.7.6.5. Međusobna zavisnost analiziranih svojstava varijanti AggLb proteina eksprimiranih na površini bakterijskih ćelija

Nakon završenog seta eksperimenata funkcionalne karakterizacije derivata koji na površini ćelije eksprimiraju AggLb sa različitim brojem kolagen vezujućih i CnaB-like vezujućih domena bilo je neohodno međusobno uporediti rezultate izračunavanja stepena autoagregacije, određivanja stepena vezivanja za imobilisani kolagen/fibronektin i sposobnosti formiranja biofilma.

Praćena je međusobna zavisnost između autoagregacije, kolagen/fibronektin vezivanja i sposobnosti formiranja biofilma kod sledećih derivata koji na površini ekspimiraju različite varijante AggLb proteina: BGKP1-20/pPIAggLb, BGKP1-20/pPI4E, BGKP1-20/pPI3C, BGKP1-20/pPI3D, BGKP1-20/pPI3E, BGKP1-20/pPI2B, BGKP1-20/pPI2D, BGKP1-20/pPI2E. Komparativna analiza pokazala je da se zapaža negativni trend korelacije između sposobnosti formiranja biofilma i autoagregacije ( $R^2$  - 0,312) (Slika 18A), vezivanja za kolagen ( $R^2$  - 0,260) (Slika 18B) i vezivanja za fibronektin ( $R^2$  - 0,242) (Slika 18C).

Izražena pozitivna korelacija uočena je između sposobnosti autoagregacije i vezivanja za kolagen ( $R^2$  - 0,652) (Slika 18D), kao i između sposobnosti autoagregacije i vezivanja za fibronektin ( $R^2$  - 0,636) (Slika 18E) kod sledećih analiziranih derivata: BGKP1-20/pPIAggLb, BGKP1-20/pKP-Lb, BGKP1-20/pPI4E, BGKP1-20/pPI3C, BGKP1-20/pPI3D, BGKP1-20/pPI3E, BGKP1-20/pPI2B, BGKP1-20/pPI2D, BGKP1-20/pPI2E, BGKP1-20/pPI1A, BGKP1-20/pPI1D i BGKP1-20/pPI1E, kao i kontrolnih sojeva BGNJ1-64, BGNJ1-641, BGKP1 i BGKP1-20.



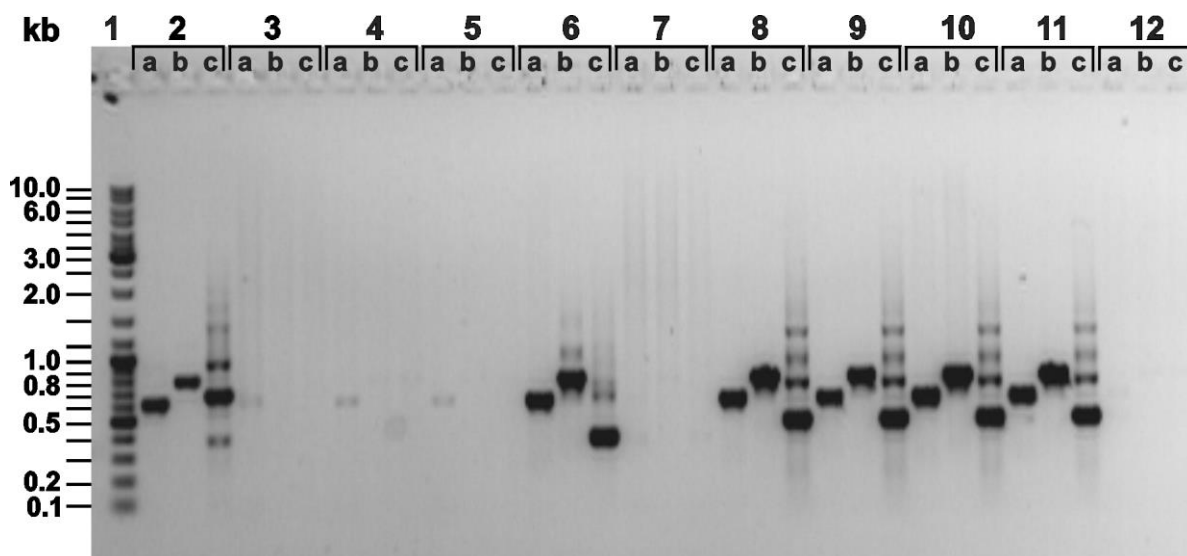


**Slika 18.** Međusobna zavisnost sposobnosti (A) autoagregacije i formiranja biofilma; (B) vezivanja za kolagen i formiranja biofilma; (C) vezivanja za fibronektin i formiranja biofilma; (D) autoagregacije i vezivanja za kolagen; (E) autoagregacije i vezivanja za fibronektin kod analiziranih sojeva i derivata koji na površini ekspimiraju varijante AggLb proteina. Slike su dobijene korišćenjem Python 2.7.8 and Scipy library (verzija 0.14.0).

#### 4.8. Selekcija sojeva koji poseduju homologe *aggLb* gena za agregacioni faktor među odabranim *Agg*<sup>+</sup> sojevima roda *Lactobacillus*

Identifikacijom nukleotidne sekvence AggLb laktobacilusnog agregacionog faktora poreklom iz soja BGNJ1-64, otvorena je mogućnost dizajniranja prajmera koji oivičavaju *aggLb* gen i pretraživanja prisustva homologog gena među odabranim sojevima roda *Lactobacillus* koji poseduju sposobnost agregacije (videti 4.1. Odabir sojeva roda *Lactobacillus* na osnovu agregacionog fenotipa).

Primenom PCR metode, korišćenjem prajmera: Agg1Fw/Agg1Rev, Agg2Fw/Agg2Rev; Agg3Fw/Agg3Rev (koji pokrivaju početak, sredinu i kraj *aggLb* gena, redom), urađena je selekcija sojeva koji poseduju gen za agregacioni faktor koji je homolog *aggLb* genu, među odabranim sojevima BGSJ2-8, BGGR2-68, BGGR2-82, BGDP1-84, BGDP9-38, BGNJ1-3, BGNJ1-61, BGNJ1-70, BGZLS30-6 i BGAR75. Dobijeni rezultati pokazali su da 6 sojeva (BGSJ2-8, BGDP1-84, BGNJ1-3, BGNJ1-61 i BGNJ1-70) od ukupno 11 analiziranih (uključujući i soj BGNJ1-64 - pozitivna kontrola u PCR reakciji) poseduju gen za agregacioni faktor koji je homolog *aggLb* genu soja BGNJ1-64 (Slika 19).



**Slika 19.** Selekcija sojeva koji poseduju gen za agregacioni faktor koji je homolog *aggLb* genu u okviru odabranih sojeva roda *Lactobacillus* na osnovu agregacionog fenotipa, primenom PCR metode koristeći prajmere: a - Agg1Fw/Agg1Rev; b - Agg2Fw/Agg2Rev; c - Agg3Fw/Agg3Rev. Redosled: 1- marker (GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder); 2- BGSJ2-8; 3- BGAR75; 4- BGGR2-68; 5- BGGR2-82; 6- BGDP1-84; 7- BGDP9-38; 8- BGNJ1-3; 9- BGNJ1-61; 10- BGNJ1-64; 11- BGNJ1-70; 12- BGZLS30-6.

Na osnovu amplifikovanih fragmenata u PCR reakciji može se zaključiti da *agg* geni koji pokazuju homologiju sa *aggLb* genom najverovatnije su različiti samo u okviru 3` kraja gena jer daju različitu veličinu fragmenata i broj amplicona samo za treći par prajmera (BGSJ2-8 i BGDP1-84 su različiti u odnosu na BGNJ grupu: BGNJ1-3, BGNJ1-61, BGNJ1-64 i BGNJ1-70). Interesantno je da su u PCR reakciji, korišćenjem Agg1Fw/Agg1Rev prajmera (dizajnirani su na osnovu sekvence u okviru 5` kraja gena) i DNK izolovane iz sojeva BGAR75, BGGR2-68 i BGGR2-82, dobijeni slabi signali odgovarajuće veličine, ukazujući na to da pomenuti sojevi poseduju gene za agregacione faktore čiji je 5` kraj gena sličan *aggLb* genu (sa manjim stepenom homologije).



## **5. DISKUSIJA**

## 5. DISKUSIJA

Na koži i u organizmu čoveka egzistira bogata mikrobiota koja čini dinamičan ekosistem od prvog dana rođenja i koja će u različitim odnosima biti prisutna tokom celog životnog veka jedinke, bitno utičući na lokalnu i sistemsku fiziologiju organizma. Sojevi BMK iz rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* i *Streptococcus* učestvuju u održavanju lokalnog ekološkog balansa GI trakta i na taj način ostvaruju pozitivan efekat na zdravstveni status individue (Bernardeau *et al.*, 2006). Veliki značaj ovih grupa bakterija, kako sa fundamentalnog tako i sa aplikativnog stanovišta, doveo je do ekspanzije u proučavanju njihovih karakteristika.

Predstavnici roda *Lactobacillus* svoj pozitivni efekat na zdravlje ljudi ostvaruju održavanjem balansa mikrobiota u GI i UG traktu, jer usled narušenog balansa, posebno između laktobacila kao prirodne zaštitne bakterijske populacije i nekih Gram-negativnih bakterija, dolazi do nastanka brojnih oboljenja (Goel *et al.*, 2006). Molekularni mehanizmi kojima se ostvaruje pozitivan efekat laktobacila na ljudski organizam, kao i funkcionalne karakteristike potencijalnih probiotičkih sojeva su još uvek nedovoljno istraženi. Probiotička uloga laktobacila se ogleda u kontinuiranoj proizvodnji mlečne kiseline, održavanju niske pH vrednosti, kao i u sintezi antimikrobnih supstanci (npr. bakteriocina). Pretpostavlja se da laktobacili svoju zaštitnu ulogu u sprečavanju rasta patogenih mikroorganizama obezbeđuju i različitim mehanizmima posredovanim imunskim sistemom domaćina (Parvez *et al.*, 2006). Osim toga, neki laktobacili poseduju adhezioni svojstva za koja se smatra da im omogućavaju bolju kolonizaciju i duže zadržavanje u GI traktu, kao i kompeticiju sa patogenim mikroorganizmima za vezivna mesta na površini epitelijalnih ćelija intestinalne mukoze, što za posledicu ima zaštitu organizma zahvaljujući sprečavanju pristupa patogena ili uklanjanje patogenih sojeva iz GI trakta (Buck *et al.*, 2005; Muñoz-Provencio *et al.*, 2009).

Veoma raznolika struktura površinskih molekula laktobacila, velikim delom, doprinosi probiotičkim svojstvima, jer omogućuje adekvatan odgovor bakterijskih ćelija na uticaj različitih faktora sredine koja ih okružuje, njihovu međusobnu komunikaciju, komunikaciju sa bakterijama koje pripadaju drugim vrstama, kao i komunikaciju sa eukariotskim ćelijama domaćina (Kleerebezem *et al.*, 2010). Pretpostavlja se da svojstvo autoagregacije laktobacila u velikoj meri doprinosi ostvarivanju pozitivnih efekata u

navedenim procesima jer je direktno povezano sa sintezom površinskih molekula. Stoga, uviđa se veći značaj studija čija je osnova bazirana na izučavanje faktora i gena koji determinišu fenomene koji doprinose pozitivnom delovanju probiotika, među kojima je i agregacija laktobacila. U literaturi, sposobnost agregacije razmatra se kao poželjna karakteristika bakterija koja doprinosi ostvarivanju pozitivnog probiotičkog potencijala soja (García-Cayuela *et al.*, 2014; Janković *et al.*, 2012; Kmet and Lucchini, 1997). Pokazano je da Apf-like protein koji obezbeđuje agregaciju soja *Lb. acidophilus* NCFM doprinosi njegovom boljem preživljavanju u GI traktu i interakciji sa površinskim molekulima ćelija intestinalne mukoze (Goh and Klaenhammer, 2010). Takođe, zapaženo je da identifikovani kompleks proteina na površini ćelija soja *Lb. helveticus* ima vrlo važnu ulogu, istovremeno, u agregaciji i adheziji za HT-29 ćelije (Waško *et al.*, 2014). Primećen je veći stepen adhezije za Caco-2 ćelije soja *Lb. crispatus* koji agregira u odnosu na njegovog neagregirajućeg mutanta (Ocaña and Nader-Macías, 2002).

S obzirom da su dosadašnja sistematska istraživanja o efikasnosti probiotika u lečenju pojedinih bolesti pokazala da je probiotički efekat specifičan za soj (Hungin *et al.* 2013; Sanders *et al.*, 2013), preporuka budućih istraživanja jeste da se okarakterišu mehanizmi kojima pojedinačni sojevi ostvaruju pozitivan efekat (Johnson and Klaenhammer, 2014). Imajući u vidu sve veći broj naučnih publikacija koje su ukazivale na značaj agregacionih proteina laktobacila u probiotičkoj aktivnosti sojeva, ali i nedovoljno informacija o karakterizaciji samih molekula koji doprinose agregacionoj sposobnosti ćelija, kao i o mehanizmima interakcije, tema ove doktorske teze je bila da se otkriju novi molekuli odgovorni za agregaciju laktobacila, karakterizacija domena ovih molekula, kao i mehanizmi kojima agregacioni faktori doprinose interakciji sa površinskim molekulima kako prokariotskih tako i eukariotskih ćelija.

Kolekcija mikroorganizama LMM sadrži jedinstvenu grupu sojeva BMK izolovanih iz različitih tradicionalnih fermentisanih mlečnih proizvoda Republike Srbije i iz regiona (sa različitih lokaliteta koji se nalaze na različitim nadmorskim visinama) koji se decenijama koriste u ljudskoj ishrani. Očekivano je da među ovim prirodnim izolatima je prisutan veliki diverzitet sojeva sa probiotičkim svojstvima. S obzirom da su ciljevi ove studije bili molekularna i funkcionalna karakterizacija molekula koji učestvuju u agregaciji laktobacila u ovom radu su iz kolekcije mikroorganizama LMM odabrani sojevi roda *Lactobacillus* koji poseduju sposobnost agregacije. Na osnovu poređenja broja detektovanih sojeva koji u tačnoj

kulturi agregiraju (ukupno 11 izolata) i ukupnog broja analiziranih sojeva roda *Lactobacillus* iz kolekcije (oko 1000 izolata) može se zaključiti da je sposobnost agregacije retko svojstvo, zastupljeno sa oko 1% među laktobacilima.

Prilikom selekcije, prvenstveno, odabirani su sojevi koji pokazuju relativno brz stepen agregacije, isti ili sličan onom koji pokazuje već okarakterisani soj iz kolekcije mikroorganizama LMM *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1 (Kojic *et al.*, 2011). Takođe, prilikom odabira sojeva se vodilo računa da se izdvoje i sojevi koji pokazuju različit tip agregacije kako bi se okarakterisao što veći broj agregacionih faktora i mehanizama interakcije. Na taj način je ustanovljeno da analizirani  $\text{Agg}^+$  sojevi laktobacila, agregiraju različitom brzinom i formiraju agregate ćelija koji su međusobno vizuelno različiti. Agregacija koju testirani izolati ispoljavaju može se kod većine sojeva svrstati u agregaciju sa vrlo izraženim stepenom autoagregacije gde prosečno 40% bakterijskih ćelija padne na dno epruvete već nakon 1 h. Kada se uporede dobijeni rezultati u ovoj studiji sa literaturnim podacima dobijenim analizom stepena autoagregacije prirodnih izolata laktobacila koji pomenuti broj agregiranih ćelija postižu tek nakon 3 h (Mathara *et al.*, 2008) ili čak nakon 20 h (García-Cayuela *et al.*, 2014), može se zaključiti da odabrani  $\text{Agg}^+$  sojevi laktobacila iz kolekcije mikroorganizama LMM izražavaju bržu agregaciju i verovatno poseduju različitu genetičku osnovu testiranog fenotipa. Pored razlike u brzini autoagregacije, odabrani  $\text{Agg}^+$  sojevi laktobacila su pokazali razlike i u tipu formiranih agregata: od veoma krupnih, izgleda pahulja koje velikom brzinom padaju na dno epruvete ostavljajući svetao (bistar) supernatant iznad ćelija, do onih koji formiraju sitne pahuljice, slične prašini i koje lagano padaju na dno epruvete ostavljajući zamućen sloj iznad agregiranih ćelija. Razlike u ovom svojstvu je bilo teško porediti sa rezultatima dobijenim u drugim laboratorijama jer o ovom fenomenu nema dovoljno dostupnih literaturnih ni fotografskih dokumenata, a nije bilo mogućnosti uvesti neke od selektovanih  $\text{Agg}^+$  sojeva iz drugih laboratorija radi direktnog poređenja (koje bi bilo najadekvatnije). Na osnovu poređenja fenotipskih karakteristika odabranih sojeva laktobacila sa dostupnim literaturnim podacima, može se zaključiti da kolekcija mikroorganizama LMM sadrži jedinstvene  $\text{Agg}^+$  sojeve koji su rezultat teritorijalne specifičnosti (endemičnosti), tradicije pripreme fermentisanih proizvoda i specifičnosti izolacije i selekcije. Uzimajući za klasifikaciju oba kriterijuma (brzina agregacije i tip formiranih agregata) možemo odabrane  $\text{Agg}^+$  sojeve podeliti u tri grupe: one koji brzo, srednje i sporije agregiraju ili koji formiraju krupne, srednje i sitne agregate, gde postoji direktna korelacija između brzine agregacije i tipa agregata. Većina odabranih  $\text{Agg}^+$  sojeva laktobacila (ukupno 6 izolata) je pokazivala

agregacioni fenotip najbliži  $\text{Agg}^+$  fenotipu soja BGKP1 ukazujući na isti ili sličan tip agregacionog faktora koji uzrokuje navedeni tip formiranja agregata i brzine agregacije.

Mehanizmi koji se navode u literaturi kojima agregacioni faktori mogu da doprinesu prednosti domaćina su koagregacija sa patogenom i njegova brza eliminacija peristaltikom iz digestivnog trakta ili vezivanje za komponente ECM-a domaćina, kompetirajući za ista vezivna mesta čime sprečavaju patogen soj da se veže, proдре u tkivo i ostvari svoj efekat (O'Toole and Cooney, 2008; Prince *et al.*, 2012; Schachtsiek *et al.*, 2004). Iz navedenih razloga su testirani  $\text{Agg}^+$  sojevi iz kolekcije mikroorganizama LMM za oba svojstva: sposobnost koagregacije sa patogenima, sposobnost vezivanja za komponente EMC i ekskluzija patogena. Najverovatnije je da je određeni agregacioni faktor odgovoran za samo jedno svojstvo, jer mogućnost istovremene interakcije površinskog proteina laktobacila sa komponentama ECM-a i sa molekulima prisutnim na površini patogenih sojeva, posledično može obezbediti kontakt patogena sa ćelijama intestinuma, duže zadržavanje u GI traktu i time olakšati ostvarivanje njegove uloge.

Sposobnost koagregacije je testirana na isti način kao i sposobnost agregacije i konstatovano je da analizirani soj laktobacila (BGNJ1-64) ne pokazuje sposobnost koagregacije sa testiranim patogenim sojevima (*S. aureus*, *E. coli* O157:H7 i *L. innocua* ATCC33090), ukazujući da agregacioni faktor(i) eksprimiran na površini testiranog soja nije uključen u direktnu interakciju sa analiziranim patogenima. Ovoj konstataciji doprinosi i činjenica da  $\text{Agg}^+$  sojevi iz kolekcije mikroorganizama LMM nemaju sposobnost koagregacije ni sa izogenim sojevima ( $\text{Agg}^-$  derivatima) koji su dobijeni spontano ili čišćenjem plazmida. Ovi podaci ukazuju da je za interakciju najverovatnije potrebno da obe ćelije koje dolaze u neposredni kontakt eksprimiraju agregacioni faktor na svojoj površini da bi došlo do njihove koagregacije. Na osnovu podataka iz literature poznato je da je koagregacija veoma često svojstvo bakterija koje nastanjuju oralnu duplju i koje se karakterišu sposobnošću formiranja biofilma, pri čemu se kontakti među bakterijskim ćelijama posredovani površinskim molekulima, tokom oba navedena procesa, karakterišu visokom specifičnošću interakcije (Rickard *et al.*, 2003).

Kada su analizirane sposobnosti vezivanja odabranih  $\text{Agg}^+$  sojeva iz kolekcije mikroorganizama LMM za komponente ECM-a zapažen je širok dijapazon sposobnosti vezivanja za kolagen, od intenzivnog afiniteta vezivanja za kolagen do odsustva sposobnosti vezivanja za matriks ili čak pojedini sojevi, BGGR2-68 i BGGR2-82, ispoljili su sposobnost

vezivanja za plastiku tj. formiranja biofilma u odnosu na ostale analizirane sojeve laktobacila. Ovakav rezultat bio je očekivan, s obzirom da je u prethodnim eksperimentima ustanovljeno da Agg<sup>+</sup> sojevi iz kolekcije mikroorganizama LMM najverovatnije ekspimiraju tri različita faktora agregacije. Definitivno, ovakvo ponašanje različitih sojeva jedne iste vrste reflektuje različit sastav i odnos komponenata na površini bakterijskih ćelija među analiziranim sojevima. U korelaciji sa ovim rezultatima su slični rezultati dobijeni u studiji u kojoj je testirano 9 sojeva roda *Lactobacillus* koji su pokazali veoma varijabilan stepen vezivanja za površinske molekule epitelijalnih ćelija (Idoui, 2014). Detekcija različitog stepena vezivanja bakterija iste vrste za isti testirani matriks u jednom eksperimentu, može biti povezana sa brojnim faktorima koji nastaju kao posledica nespecifičnih interakcija usled različitog naelektrisanja i hidrofobnosti na površini bakterijskih ćelija ili kao posledica prisustva proteinskih komponenti koje su uključene u proces adhezije i vezivanja za ugljenohidratne komponente na površini crevnog mukusa (Saito, 2004). Krajnji odgovor ćelija je rezultanta uticaja svih površinskih faktora koji zasigurno imaju različit doprinos.

Iako je među analiziranim sojevima laktobacila zapažen međusobno različit stepen autoagregacije, kao i različit afinitet vezivanja za kolagen, zajednička karakteristika svim sojevima koji agregiraju jeste osetljivost na tretman proteinazom K. Na osnovu ovog eksperimenta može da se zaključi da su faktori uključeni u agregaciju, koji dovodi do međusobne interakcije bakterijskih ćelija kao i do njihove interakcije sa komponentama ECM-a, proteinske prirode. U prilog ovom zaključku ide i od ranije poznat rezultat da je u soju *Lb. paracasei* BGSJ2-8 na površini ćelija prisutan protein veći od 200 kDa, koji odsustvuje u neagregirajućem spontano dobijenom Agg<sup>-</sup> mutantu BGSJ2-81 i koji dominantno determiniše površinske karakteristike ćelija i sposobnost agregacije (Lozo *et al.*, 2007).

Dosadašnji rezultati su pokazali da se genetičke determinante za ekspresiju agregacionih faktora nalaze na plazmidima. Za laktokokalni soj BGKP1 ustanovljeno da je gen koji kodira agregacioni faktor AggL lociran na plazmidu pKP1 od 16,1 kb (Kojic *et al.*, 2011). U ranijim laboratorijskim istraživanjima pokazano da u soju BGSJ2-8 nakon presejavanja sa -80°C na 30°C neke ćelije spontano gube sposobnost autoagregacije, koja se može najlogičnije objasniti plazmidnom lokalizacijom gena koji su odgovorni za agregacioni fenotip bakterija (Lozo *et al.*, 2007). U sledećem eksperimentalnom koraku konstatovano je da svi analizirani sojevi laktobacila u ovom radu poseduju kako velike plazmide (veličine

preko 20 kb) tako i manje plazmide, a na osnovu prethodnih istraživanja osnovano je zaključiti da je/su gen/geni koji kodira/ju agregacioni protein odgovoran za sposobnost soja da agregira u tečnoj kulturi lociran/i na plazmidu/ima. Kao rezultat eksperimenta čišćenja plazmida, u ovom radu potvrđena je plazmidna lokalizacija gena za agregacioni faktor u soju BGNJ1-64 tj. pokazano je, u odnosu na divlji soj, odsustvo pNJ1 plazmida u čišćenim derivatima, što se dovodi u korelaciju sa gubitkom fenomena autoagregacije kod očišćenog derivata BGNJ1-641.

S obzirom da u literaturi nema mnogo podataka o genima koji kodiraju za agregacione faktore laktobacila i da prethodni rezultati čišćenja plazmida jasno ukazuju da su genetičke determinante koje kodiraju agregacioni faktor/e laktobacila (grupe *Lb. casei* iz kolekcije mikroorganizama LMM) locirane na plazmidu/ima, primenjen je sličan pristup kloniranja gena kao i za soj BGKP1 (*aggL* gen kodira AggL agregacioni faktor). Da bi se utvrdilo da su geni koji kodiraju agregacione faktore odabranih Agg<sup>+</sup> sojeva iz kolekcije mikroorganizama LMM različiti od već kloniranog *aggL* gena laktokoka (s obzirom da većina sojeva ispoljava isti ili sličan tip agregacije kao i soj BGKP1), urađena je DNK-DNK hibridizacija sa plazmidima laktobacila koristeći obeležen *aggL* gen kao probu gde je pokazano da nema homologije. Ovaj rezultat je pokazao da su genetičke determinante za agregacione faktore laktokoka i laktobacila različite iako ispoljavaju identičan agregacioni fenotip za razliku od npr. proteinaznih *prtP* gena kod ove dva roda bakterija koji pokazuju visoku homologiju (Kojic *et al.*, 1991). U cilju kloniranja nepoznatog/ih agregacionog/ih faktora, konstruisane su plazmidne biblioteke sojeva BGNJ1-64 i BGSJ2-8 jer je za njih pokazano da su geni koji kodiraju agregacione faktore locirani na plazmidima. Biblioteke su konstruisane korišćenjem većeg broja enzima u cilju očuvanja intaktnosti gena, s obzirom da je bila poznata činjenica da je agregacioni faktor soja BGSJ2-8 velike molekulske mase > od 200kDa (Lozo *et al.*, 2007). Analizom transformanata izolovan je konstrukt pALb35, koji nosi *SacI* fragment veličine 11,4 kb, poreklom iz plazmida pNJ1 soja BGNJ1-64, koji nakon njegove heterologe ekspresije, obezbeđuje ponovnu pojavu autoagregacionog fenotipa transformisanog heterologog domaćina BGKP1-20 (Agg<sup>-</sup>). Za ekspresiju gena koji kodira agregacioni faktor laktobacila odabran je laktokokalni domaćin BGKP1-20 iz dva razloga: izogeni Agg<sup>-</sup> derivat BGNJ1-641 se pokazao netransformabilan, dok je soj BGKP1-20 Agg<sup>-</sup> derivat soja koji ekspresira veoma sličan agregacioni fenotip (ukoliko su za ispoljavanje agregacionog fenotipa neophodni još neki ćelijski faktori). Pretpostavljeno je da ekspresija gena za agregacioni faktor poreklom iz soja BGNJ1-64 može biti različita u različitim sojevima u

zavisnosti od funkcionalnosti promotora, transkripcije, translacije i transporta kroz membranu. Stoga, urađena je i transformacija soja *E. faecalis* BGZLS10-27 ( $\text{Agg}^-$ ), odnosno ekspresija konstrukta pALb35 u enterokokalnom domaćinu, nakon čega je dobijen derivat BGZLS10-27/pALb35 koji je posedovao sposobnost agregacije ( $\text{Agg}^+$ ). Međutim, nisu uočene značajnije razlike u stepenu agregacije laktokokalnih i enterokokalnih derivata koji na površini ekspimiraju agregacioni faktor poreklom iz laktobacila ukazujući na generalno dobru prepoznatljivost regulatornih sekvenci *agg* gena od strane transkripciono-translacione i transportne mašinerije većeg broja vrsta bakterija.

Na osnovu bioinformatičke analize sekvence utvrđeno je da konstrukt pALb35 sadrži *SacI* klonirani fragment veličine 11377 bp i sastoji se od četiri ORF-a (*aggLb* gen okružen sa tri gena koji kodiraju transpozaze). Gen *aggLb*, odgovoran za sposobnost autoagregacije soja BGNJ1-64, sadrži 8994 bp u okviru konstrukta pALb35. Prvih 4523 bp *aggLb* gena deli 99% identičnosti sa genima koji kodiraju za nepoznati protein identifikovan u sojevima: *Lb. casei* W56, LC2W i BDII koji poseduju sposobnost agregacije. Interesantno je napomenuti da su geni koji pokazuju visok stepen homologije sa *aggLb* genom locirani na plazmidima različite veličine u sva tri sekvencirana soja laktobacila (pW56 = 56316 bp, pLC2W = 38392 bp i pBDII = 57362 bp). Geni prisutni u okviru plazmida navedenih sekvenciranih sojeva, koji pokazuju visok stepen homologije sa *aggLb* genom, okarakterisani su kao hipotetični geni, s obzirom da autori nisu klonirali, ekspimirali date gene i potvrdili vezu sa agregacijom sojeva. Drugi deo *aggLb* gena (4524–8994 bp) sadrži brojne ponovke koji ne pokazuju sličnost sa nijednim dostupnim genom u bazi podataka, a ovaj region može dodatno biti podeljen na 18 potpuno identičnih ponovaka. Upravo, zbog prisustva ponovljenih identičnih sekvenci u okviru gena, prilikom sekvenciranja konstrukta pALb35 bilo je teško utvrditi celokupnu sekvencu, a ovaj problem se može javiti kod svih proteina slične strukture. Može se pretpostaviti da agregacioni faktori sekvenciranih sojeva (W56, LC2W i BDII) su iste ili slične molekulske mase kao i *AggLb*. Problem sekvenciranja je uspešno prevaziđen primenom sledećih pristupa: subkloniranjem malih fragmenata iz konstrukta pALb35 (konstrukt koji sadrži celokupnu sekvencu) i njegovom delecijom analizom sa jednog kraja molekula koristeći ExoIII/S1 nukleazni tretman. Problem ponovaka većih od jedne kilobaze ne može se prevazići bez subkloniranja i delecione analize ni jednim dosadašnjim sistemom sekvenciranja: klasičnim Sangerovim sa dideoksi nukleotidima ni pirosekvenciranjem [NGS: platforme 454 ili Solexa (Illumina)].



Uporednom analizom veličina kloniranog fragmenta u *E. coli* (konstrukt pALb35) i *aggLb* gena prisutnog u prirodnom plazmidu pNJ1 soja BGNJ1-64, primenom DNK-DNK hibridizacije, pokazano je da nije došlo do rearazmana ni duplikacija prilikom kloniranja i propagacije *SacI* fragmenta veličine 11,4 kb u *E. coli* što je potvrdilo stabilnost fragmenata laktobacila kloniranih u pAZIL-SJ vektor. Ovakav vid eksperimentalne potvrde nepromenjenosti klona tokom genetičkih manipulacija prilikom konstrukcije pALb35 bio je neophodan s obzirom na prethodna eksperimentalna iskustva (insercije/delecije u okviru kloniranih fragmenata poreklom iz BMK u *E. coli*).

Analizom aminokiselinske sekvence utvrđeno je da je AggLb najveći agregacioni faktor laktobacila do sada opisan u literaturi, veličine 318,6 kDa. Na osnovu programa predikcije proteina, pretpostavljeno je da na N-terminalnom kraju proteina se nalazi signalni peptid koji se iseca između 30 i 31 aminokiseline (alanin/valin). AggLb protein sadrži dva različita tipa domena koji su u literaturi opisani kao veoma značajni za sposobnost adhezije: kolagen vezujući domeni na N-terminalnom kraju proteina (6 puta ponovljeni aminokiselinski ponovci koji međusobno pokazuju veliku heterogenost; sa stepenom homologije manjim od 26%) i CnaB-like domeni na C-terminusu proteina (20 puta ponovljeni aminokiselinski ponovci). Pomenuti protein na C-terminalnom kraju poseduje domen za vezivanje za ćelijski zid (LPXTG) koji prepoznaje enzim sortaza koja seče između treonina i glicina (u AggLb proteinu na poziciji 2961/2965 ak nalazi se MPNTG sekvenca) i kovalentno vezuje karboksilnu grupu treonina za amino grupu prekursora peptidoglikana, a nakon ove reakcije protein ostaje kovalentno vezan za PG i ispoljava svoju funkciju na spoljašnjoj površini bakterije (Marraffini *et al.*, 2006). Signalna sekvenca u AggLb protein (MPNTG) ili predstavlja varijantu sekvence koju prepoznaje izmenjeni enzim sotraza u *Lb. paracasei*, pokazano je u literaturi da postoje različiti tipovi sortaza koji prepoznaju različite varijante LPXTG sekvence (Boekhorst *et al.*, 2005; Spirig *et al.*, 2011) ili je ovaj protein izgubio sposobnost kovalentnog vezivanja za ćelijski zid. Neposredno iza ove sekvence nalazi se transmembranski domen na poziciji od 2970–2989 ak u okviru AggLb proteina i sekvenca koja je locirana u citoplazmi što ukazuje da je možda drugačiji mehanizam ukotvljavanja ovog proteina u ćelijski zid. Analizom sekvence drugih poznatih agregacionih faktora je pokazano: AggL laktokoka poseduje tipičnu LPXTG sekvencu iza koje ne sledi transmembranski domen, dok sva tri agregaciona faktora iz sojeva *Lb. casei* W56, LC2W i BDII poseduju identičan motiv na C-terminusu, MPNTG kao i AggLb iza koga je lociran transmembranski domen. Pokazano je da derivat 1063N soja *Lb. reuteri* ATCC 53608 (koji

eksprimira na površini MUB protein), usled mutacije produkuje kraći MUB protein kojem nedostaje C-terminalni LPxTG region, usled čega ne može da ostane vezan za ćelijski zid, što posledično dovodi do smanjene sposobnosti vezivanja za mukus i sposobnosti agregacije mutanta 1063N (MacKenzie *et al.*, 2010). Sličan fenomen je pokazan i za proteinazu PrtP tipa laktokoka koja poseduje LPXTG motiv i vezana je za ćelijski zid, ali se autokatalitički odseca i odvaja u spoljašnju sredinu (Laan and Konings, 1990).

Zanimljivo je da AggLb protein, iako ne pokazuje visok nivo homologije na nukleotidnom (nedektabilni nivo homologije) i aminokiselinskom nivou (22,3%) deli sličnu sekundarnu strukturu sa laktokokalnim agregacionim faktorom AggL. Strukturno, AggLb je mnogo duži protein s obzirom da poseduje 20 CnaB-like domena, u odnosu na AggL protein koji ima 7 CnaB-like domena. Pretpostavlja se da CnaB-like domeni imaju ulogu “merdevina” koje ističu kolagen vezujuće domene što dalje od površine ćelije kako bi se lakše omogućila njihova funkcija u interakciji sa određenim komponentama (Deivanayagam *et al.*, 2000).

U cilju razumevanja samostalnog doprinosa *aggLb* gena u ostvarivanju uloge u probiotičkom potencijalu soja BGNJ1-64 urađeni su eksperimenti funkcionalne karakterizacije AggLb proteina eksprimiranog na površini heterolog domaćina BGKP1-20 koji ne poseduje sposobnost agregacije jer samo u sistemu gde se koriste dva soja koji poseduju jedinu razliku u kloniranom genu može se izmeriti direktan doprinos eksprimiranog gena. Polazna pretpostavka bila je da se prisutnošću agregacionog faktora na površini bakterijske ćelije obezbeđuje bolja komunikacija između bakterija i komponenti prisutnih na površini ćelija intestinalnog trakta. Laktobacili poseduju brojne površinske proteine koji im omogućavaju vezivanje za mukus, kolagen, fibronektin, laminin ili fibrinogen (Styriak *et al.*, 2003; Yadava *et al.*, 2013). Obično, bakterije na svojoj površini eksprimiraju veći broj adhezivnih molekula, npr. soj *Lb. plantarum* poseduje mukus i fibronektin vezujući protein (Kaushik *et al.* 2009). Laktobacili poseduju sposobnost interakcije sa svim tipovima kolagena (kolagen tipa I, II i III), s tim što je vezivanje za kolagen tipa I, molekul prisutan u mekim tkivima organizma, mnogo zastupljenije među testiranim izolatima laktobacila (Aleljung *et al.*, 1991; Aleljung *et al.*, 1994). Poređenjem stepena vezivanja analiziranih sojeva i derivata koji poseduju sposobnost agregacije (BGSJ2-8, BGNJ1-64 i BGKP1-20/pALb35) sa derivatima kod kojih je pomenuto svojstvo odsutno (BGSJ2-81, BGNJ1-641, BGKP1-20/pAZIL) uočen je doprinos eksprimiranog AggLb proteina na površini bakterijske ćelije u

interakciji sa imobilisanim kolagenom tipa I. Intenzivno vezivanje bakterija za kolagen predstavlja veoma poželjnu karakteristiku probiotičkih sojeva s obzirom da se na taj način omogućava ne samo adhezija i posledično duže zadržavanje bakterija u GI traktu, već i kompeticija sa patogenim sojevima za ista vezivna mesta na enterocitama. Iz literature je poznato da 75% od 110 testiranih izolata laktobacila pokazuje sposobnost vezivanja za kolagen tipa I u *in vitro* uslovima (Aleljung *et al.*, 1991). Na tesnu vezu između faktora koji doprinose agregaciji soja i adheziji za komponente ECM-a ukazuje studija u kojoj je utvrđeno svojstvo vezivanja vaginalnih izolata laktobacila koji poseduju sposobnost autoagregacije za kolagen tipa I (Styriak *et al.*, 2001). Svojstvo vezivanja za kolagen kod patogenih sojeva predstavlja virulentni faktor, stoga prisustvo površinskih bakterijskih proteina koji učestvuju u interakciji sa komponentama ECM-a je od velikog značaja. Pokazano je da mutant soja *S. aureus* koji na svojoj površini ne eksprimira protein koji ima ulogu u vezivanju za kolagen posledično se ne vezuje za površinske molekule keratinocita (Rhem *et al.*, 2000).

Adhezivnim svojstvima BMK doprinose i interakcije posredovane slabim elektrostatičkim vezama, pasivnim i hidrofobnim sternim silama (Servin, 2004). Kao pokazatelj hidrofobnosti površine testiranih sojeva i derivata korišćen je test afiniteta za organske rastvarače. Neobično velika razlika u procentu adhezije za heksadekan (preko 75%) sojeva BGNJ1-64 i BGKP1-20/pALb35 koji agregiraju u odnosu na sojeve BGNJ1-641 i BGKP1-20/pAZIL koji nemaju sposobnost agregacije, pokazana u ovom radu, ukazuje na to da se na površini ćelija soja BGNJ1-64 i BGKP1-20/pALb35 nalaze proteini koji njegovu površinu čine hidrofobnom. Visoka hidrofobnost je i u predhodnim istraživanjima bila povezana sa autoagregacijom, preko 70% ćelija soja *Lb. plantarum* IS-10506, koji ispoljava visoki stepen autoagregacije, su se vezale za ksilen (Collado *et al.*, 2007). Dodatno, brojne druge studije potvrdile su vezu između fizičko hemijskih faktora koji doprinose hidrofobnosti bakterija i sposobnosti adhezije za površinske ćelijske komponente ili inertne površine (McGrady *et al.*, 1995; Reid *et al.*, 1992). Interesantni su rezultati istraživanja u kojima je primećeno da derivat soja *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 pokazuje rezistenciju na žučne soli i bolje preživljava fiziološke koncentracije žučnih soli i intestinalnog soka u *in vivo* eksperimentina na miševima, iako ima smanjenu hidrofobnost ćelijske površine, smanjenu autoagregaciju i adhezivne sposobnosti u odnosu na parentalni soj (Burns *et al.*, 2011). Osim toga, u ovom radu je pokazana razlika u procentu adhezije za hloroforma i etil acetat kod sojeva koji agregiraju u odnosu na sojeve koji nemaju sposobnost agregacije. Sojevi BGNJ1-64 i BGKP1-20/pALb35 su pokazali veći afinitet vezivanja za hloroform (monopolarni, kiseli

rastvarač) u odnosu na etil acetat (monopolarni bazni rastvarač). Ovaj rezultat ukazuje na to da je AggLb jak donor elektrona i slabiji primalac elektrona, što posledično dominantno determiniše površinske osobine ćelija nosilaca. U korelaciji sa ovim rezultatima su i rezultati studije u kojoj je detektovan sličan trend procenata adhezije za heksadekan, hloroform i etil acetat sojeva *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* i *Lb. rhamnosus* (Pelletier *et al.*, 1997).

Kao što je već pomenuto, kompeticija laktobacila sa patogenim sojevima za specifične receptore na površini eukariotskih ćelija je jedan od mogućih mehanizama ostvarivanja probiotičkog efekta. Literaturni podaci ukazuju na pozitivnu korelaciju između stepena adhezije i inhibicije patogenih sojeva od strane laktobacila (Li *et al.*, 2008). Ranije je pokazano da stepen kompeticije između laktobacila i patogenih sojeva za receptorna mesta vezivanja zavisi od prisustva ugljenohidratnih komponenti na površini bakterijskih ćelija (Lee and Puong, 2002). Takođe, pokazano je da proteinske površinske komponente kao što su proteini S-sloja laktobacila mogu imati presudnu ulogu u procesu inhibicije vezivanja patogena za komponente ECM-a u *in vitro* eksperimentima (Yadav *et al.*, 2013). Dobijeni rezultati u ovom radu, pokazali su da AggLb protein ima ulogu u inhibiciji vezivanja patogenih sojeva *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 za imobilisani kolagen tipa I. U ovom eksperimentu su korišćena dva soja koji su predstavnici patogena, jedna Gram-pozitivna i druga Gram-negativna bakterija. Dobijeni rezultati ukazuju da je sposobnost kompeticije bakterija koje ekspimiraju AggLb protein za vezivne molekule ECM-a jača od adhezina (virulentnih faktora) korišćenih predstavnika ove dve grupe bakterija. Dobijeni rezultati značajno doprinose razjašnjavanju dileme koja se odnosi na mogućnost agregacionih faktora da istovremeno obavljaju funkcije koje mogu negativno uticati jedna na drugu. Naime, u jednom od prethodnih eksperimata, pokazano je da AggLb protein ne učestvuje u procesu koagregacije patogenih sojeva, ali poseduje značajnu ulogu u autoagregaciji bakterija, adheziji za epitelijalne ćelije intestinalne mukoze, kao i u ekskuziji patogena. Dobijeni rezultati ističu agregacioni faktor kao površinski protein odgovoran samo za autoagregaciju i interakciju sa komponentama ECM-a, jer u slučaju istovremene interakcije i sa molekulima prisutnim na površini ćelija patogena, AggLb protein bi najverovatnije pospešivao infekciju, dovodeći patogeni soj u blizak kontakt sa ćelijama intestinuma. U literaturi postoje podaci o uspešnom isključivanju enteropatogenih sojeva od strane testiranih laktobacila za vezivanje za Caco-2. Međutim, primećeno je da sposobnost inhibicije vezivanja enteropatogena u mnogome zavisi kako od vrste patogena tako i od testiranog soja laktobacila. *Lb. casei*

TMC0409 veoma efikasno vrši inhibiciju adhezije *S. typhimurium* ATCC 29631, dok manje-adhezivni soj *Lb. rhamnosus* LA-2 mnogo efektivnije sprečava vezivanje *L. monocytogenes* ATCC15313 (Gueimonde *et al.*, 2006).

Kako bismo sagledali doprinos pojedinačnih domena u okviru AggLb proteina u ostvarivanju njegovih do sada pomenutih pozitivnih efekata, ispitivana je uloga varijanti AggLb proteina eksprimiranih na površini laktokokalnog domaćina BGKP1-20. U ovoj studiji raspolagali smo konstruktima koji u različitim kombinacijama sadrže: kolagen vezujuće domene (6, 2, 1+1/2 ili 0 (bez domena)) i CnaB-like domene (20, 10, 7, 5 ili 2). Širok dijapazon konstruisanih varijanti AggLb proteina (od najvećeg 318,6 kDa do najmanjeg 34,2 kDa), funkcionalno je okarakterisan u *in vitro* eksperimentima. Da bi se obezbedila ujednačena ekspresija svih varijanti AggLb proteina sve genske varijante su eksprimirane pod istim promotorom i sadržavale su sve neophodne regione za eksport i ukotvljavanje, što je i potvrđeno Dot blot analizom koristeći antitelo proizvedeno u mišu na region AggLb proteina koji je prisutan u svim varijantama ovog proteina. Interesantno je navesti i podatak da je u nekoliko navrata pokušano da se pokaže i veličina proteina u različitim AggLb varijantama Western blot analizom ali delimično uspešno jer je pozitivan rezultat dobijen samo sa varijantama koje ne dovode do agregacije bakterija što ukazuje da formiranje agregata definitivno interferira sa nekim od procesa bilo transfera proteina na membranu ili interakcije sa antitelom.

Najpre, testiran je stepen autoagregacije varijanti AggLb eksprimiranih na površini bakterijskih ćelija. S obzirom da AggLb protein na N-terminusu poseduje šest heterogenih kolagen vezujućih domena (koji pokazuju različit doprinos u autoagregaciji ćelija), varijante AggLb koje su imale deletirane kolagen vezujuće domene II, III i IV nisu pokazivale sposobnost agregacije. Navedena tri domena su izuzetno bitna za funkciju AggLb proteina kao agregacionog faktora. Ranije je pomenuto da se C-terminus AggLb proteina sastoji od 20 CnaB-like vezujućih domena (skoro 100% međusobno identični). Interesantno, soj BGKP1-20/pPI4E koji eksprimira AggLb protein kome nedostaje osamnaest CnaB-like domena ispoljava isti nivo agregacije kao i polazni soj ukazujući da CnaB-like domeni najverovatnije nemaju direktnu ulogu u agregaciji molekula već u isturanju N-terminalnog dela koji nosi kolagen vezujuće domene što dalje od površine ćelije kako bi se što efikasnije omogućila interakcija ovih domena sa receptornim molekulima koji mogu biti na različitoj udaljenosti od bakterijskih ćelija unutar EMC-a. Iz literature je poznato da funkcionalnost agregacionih

proteina nije u direktnoj vezi sa brojem prisutnih CnaB-like domena (Deivanayagam *et al.*, 2000). Važno je napomenuti da su navedeni zaključci dobijeni na osnovu rezultata u *in vitro* testovima, što ne isključuje mogućnost korelacije funkcionalnosti agregacionih proteina i broja CnaB-like domena u *in vivo* istraživanjima.

Primećen je veoma sličan trend vezivanja analiziranih derivata koji na površini ekspimiraju različite varijante AggLb proteina za imobilisani fibronektin na ploči kao i za imobilisani kolagen. Prvenstveno je uočeno da se derivat koji poseduje svih šest kolagen vezujućih domena i samo 2 CnaB-like domena (BGKP1-20/pPI4E) sa sličnim, visokim, afinitetom vezuje se za imobilisani kolagen i fibronektin. U eksperimentima praćenja stepena autoagregacije varijanti AggLb ekspimiranih na površini bakterijskih ćelija ovaj derivat je pokazao najveći stepen autoagregacije. S druge strane, najmanji stepen adherentnosti za kolagen zapažen je kod derivata BGKP1-20/pPI2B, dok je najmanji stepen vezivanja za fibronektin zapažen kod derivata BGKP1-20/pPI2B i BGKP1-20/pPI1D. Derivat BGKP1-20/pPI2B poseduje 1+1/2 (1/2 V i VI) kolagen vezujućih domena i 10 CnaB-like domena, dok derivat BGKP1-20/pPI1D nema kolagen vezujuće domene i ima 5 CnaB-like domena. Na osnovu navedenih podataka možemo zaključiti, da na sposobnost analiziranih derivata u vezivanju za kolagen i fibronektin presudno utiče varijanta AggLb proteina ekspimirana na površini bakterijske ćelije koja sadrži kolagen vezujuće domene II, III i IV. Dobijeni rezultati ukazuju da je važniji tip u odnosu na broj kolagen vezujućih domena prisutnih u proteinu što je u korelaciji sa prethodno dobijenim rezultatima (AggL agregacioni faktor laktokoka sa istim intenzitetom obavlja funkciju sa tri kolagen vezujuća domena, dok stafilokokalni agregacioni faktor sa samo jednim domenom; Kojic *et al.*, 2011 i Deivanayagam *et al.*, 2000), i da kolagen vezujući domeni, bez obzira na broj prisutnih CnaB-like domena, dominantno određuju funkcionalnost AggLb proteina.

Dodatno, hibridni protein koji sadrži prvi deo laktokokalnog agregacionog faktora i drugi deo laktobacilusnog faktora agregacije, ne pokazuje sposobnost agregacije i vezivanja za imobilisani kolagen i fibronektin na ploči. Ovaj rezultat ukazuje da funkcionalnost agregacionih faktora u mnogome zavisi od strukture i konformacije proteina koja je proizvod kombinacije prisutnih kolagen vezujućih i CnaB-like domena u proteinu.

Veza između sposobnosti formiranja biofilma i autoagregacije kod laktobacila je sve češće izučavan fenomen u poslednjoj dekadi. Već je pomenuto da soj BGGR2-68 koji poseduje sposobnost autoagregacije, istovremeno se vezuje i za plastiku. Interesantno bi bilo

utvrditi da li su ove dve pomenute funkcije u tom soju povezane sa istim proteinom. AggA protein eksprimiran na površini soja *Shewanella oneidensis* MR-1 obezbeđuje njegovu agregaciju i odgovoran je za sposobnost formiranja biofilma u inicijalnim fazama procesa. Mutant u *aggA* genu, ne poseduje sposobnost agregacije i zapaža se odsustvo sposobnosti formiranja biofilma. Komplementacijom ovog mutanta, vektorom koji obezbeđuje ekspresiju AggA proteina, efekat formiranja biofilma biva normalizovan i sveden na nivo divljeg soja (De Windt *et al.*, 2006). Dodatno, SasC protein soja *S. aureus* uključen je u proces agregacije, formiranja biofilma i kolonizacije tokom infekcije. N-terminalni domen SasC proteina uključen je u produkciju ćelijskih agregata, koji se vezuju za polistiren i povećavaju stepen formiranja biofilma (Schroeder *et al.*, 2009). O proteinima Gram-pozitivnih bakterija koji učestvuju u formiranju biofilma ne postoji puno literaturnih podataka. Jedan od najbolje izučavanih proteina iz ove grupe, jeste Bap protein prisutan na površini *S. aureus* koji pored toga što ima ulogu u procesu formiranja biofilma učestvuje i u formiranju agregata (Taglialegna *et al.*, 2016). Fenomen agregacije i formiranje biofilma su procesi u kojima učestvuje veliki broj bakterijskih ćelija i koji omogućuju zajednici otpornost u stresnim uslovima. S obzirom da je reč o sličnim procesima, ne čudi da isti protein može biti uključen u obe funkcije (agregacija i formiranje biofilma). U prehrambenoj industriji, posebno je važno utvrditi i okarakterisati aktivne sastojke koji mogu da inhibiraju formiranje bakterijskog biofilma, s obzirom da je formiranje biofilma od strane patogenih bakterija veoma čest fenomen koji rezultira visokom otpornošću na različite tretmane (Söderling *et al.*, 2011; Furukawa, 2015).

Analiza sposobnosti formiranja biofilma testiranih derivata koji na površini eksprimiraju varijante AggLb proteina pokazala je da derivati BGKP1-20/pPI2D, BGKP1-20/pPI3C, BGKP1-20/pPI3D i BGKP1-20/pPI3E pokazuju veći afinitet vezivanja za plastiku u odnosu na ostale testirane derivate koji eksprimiraju preostale varijante AggLb proteina, derivat koji na svojoj površini eksprimira intaktan *aggLb* gen (BGKP1-20/pPIAggLb) i divlji soj (BGNJ1-64). Može se zaključiti da uklanjanje određenih domena ne samo da onemogućava funkcije autoagregacije i vezivanja za komponente ECM-a kod pojedinih derivata koji na površini eksprimiraju određene varijante AggLb proteina, već istovremeno rezultira mogućnošću pojedinih varijanti AggLb proteina da dođu do izražaja (bivaju demaskirani otklanjanjem drugih domena) i preuzmu funkciju formiranja biofilma.

Sekveniranjem *aggLb* gena omogućeno je dizajniranje setova prajmera specifičnih za tri regiona gena tako da je ustanovljeno da među analiziranim sojevima roda *Lactobacillus* koji imaju sposobnost agregacije, sojevi BGSJ2-8, BGDP1-84, BGNJ1-3, BGNJ1-61 i BGNJ1-70 poseduju gen za agregacioni faktor koji je homolog *aggLb* genu soja BGNJ1-64. Dizajnirani prajmeri su se pokazali izuzetno selektivni, čak toliko da diskriminiraju različite varijante *aggLb* gena tako da mogu biti korišćeni u budućim studijama selekcije. Na osnovu analize rezultata može se zaključiti da su *agg* geni koji pokazuju homologiju sa *aggLb* genom različiti u C-terminalnom regionu proteina, što se može objasniti različitim brojem prisutnih Cna-B-like domena u okviru agregacionih faktora (što se vidi kao lestvica fragmenata koji mogu biti različite dužine). Dodatno, rezultati PCR-a dobijeni korišćenjem DNK sojeva BGAR75, BGGR2-68 i BGGR2-82 ukazuju na to da ovi sojevi možda poseduju gene za agregacione faktore čiji je N-terminus sličan AggLb proteinu (ali sa daleko manjim stepenom homologije).

Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da agregacioni faktori pripadaju heterogenoj grupi površinskih proteina koji u mnogome doprinose svojstvima bakterijskog soja koji ih ekspimiraju. Rezultati ovog rada su pokazali da se u okviru samo jedne vrste bakterija (*Lb. paracasei*) unutar samo jedne laboratorijske kolekcije mogu izolovati sojevi sa najmanje tri tipa agregacionih faktora ukazujući na veliku raznovrsnost agregacionih faktora. Ono što je zajedničko među do sada opisanim faktorima agregacije (čak i među patogenim sojevima) da je većina od njih sastavljena od većeg broja domena koji doprinose različitim stepenom u funkciji agregacije, interakciji sa komponentama ECM-a i formiranju biofilma.

Rezultati ove studije doprineli su karakterizaciji jednog novog agregacionog faktora koji podržavaju teoriju o strukturnoj, a ne sekvencnoj sličnosti agregacionih proteina kao i rasvetljavanju doprinosa pojedinih domena proteina i njihovoj ulozi u interakciji sa drugim bakterijama (iste ili različite vrste), sredinom i komponentama ECM-a domaćina.



## **6. ZAKLJUČCI**

## 6. ZAKLJUČCI

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

1. Sojevi roda *Lactobacillus* iz kolekcije mikroorganizama LMM korišćeni u ovom radu izabrani na osnovu stepena agregacije i tipa formiranih agregata mogu se klasifikovati u tri grupe: oni koji brzo, srednje i sporije agregiraju ili koji formiraju krupne, srednje i sitne agregate, gde postoji direktna korelacija između brzine agregacije i tipa agregata. Ustanovljeno je da sposobnost agregacije nije često svojstvo (zastupljeno sa oko 1% među laktobacilima) sa velikom raznovrsnošću (najmanje tri tipa agregacionih faktora među 11 testiranih sojeva) što ukazuje na važnost otkrivanja i karakterizacije novih agregacionih molekula u cilju definisanja zajedničkih mehanizama interakcije.
2. Za dva soja (BGNJ1-64 i BGSJ2-8) je potvrđeno da su genetičke determinante za ekspresiju agregacionih faktora locirane na velikim plazmidima koji su iskorišćeni za konstrukciju plazmidnih biblioteka u *E. coli*. *SacI* fragment veličine 11,4 kb poreklom iz plazmida pNJ1 soja BGNJ1-64 (konstrukt pALb35), obezbedio je ponovnu pojavu autoagregacionog fenotipa transformisanog heterologog domaćina BGKP1-20 (Agg<sup>-</sup>).
3. Novootkriveni gen *aggLb* (koji kodira AggLb protein), odgovoran je za sposobnost autoagregacije soja BGNJ1-64. AggLb protein je najveći do sada u literaturi opisan agregacioni faktor laktobacila lociran na površini ćelije, veličine 318.6 kDa. Pored svih neophodnih domena za eksport i ukotvljavanje, AggLb protein sadrži dva različita tipa domena koji su veoma značajni za sposobnost adhezije: kolagen vezujući domeni na N-terminusu proteina (6 domena koji međusobno pokazuju veliku heterogenost; sa stepenom homologije manjim od 26%) i CnaB-like domeni na C-terminusu proteina (20 skoro identičnih ponovaka).
4. AggLb protein eksprimiran na površini ćelija odgovoran je za autoagregaciju ćelija i interakciju sa komponentama ECM-a (kolagen i fibronektin), dok njegov doprinos u koagregaciji patogenih sojeva nije detektovan što ukazuje da AggLb protein najverovatnije vezujući ćelije laktobacila za komponente ECM-a formira barijeru zaštite od patogena.
5. Konstrukcijom varijanti AggLb proteina (koje sadrže različit broj kolagen vezujućih i CnaB-like domena) i hibridnog proteina koji sadrži prvi deo laktokokalnog

agregacionog faktora i drugi deo laktobacilusnog faktora agregacije omogućeno je sagledavanje doprinosa pojedinačnih domena kao i različitih tipova kolagen vezujućih motiva u interakciji sa receptornim molekulima.

6. Ustanovljena je direktna korelacije između agregacije ćelija i vezivanja za komponente ECM-a (kolagen i fibronektin). Za navedene sposobnosti AggLb proteina najodgovorniji su kolagen vezujući domeni II, III i IV. CnaB-like domeni najverovatnije nemaju direktnu ulogu u agregaciji i vezivanju za kolagen i fibronektin, već se njihov doprinos ogleda u pozicioniranju kolagen vezujućih domena što dalje od površine ćelije kako bi se što efikasnije omogućila interakcija ovih domena sa receptornim molekulima koji mogu biti na različitoj udaljenosti od bakterijskih ćelija unutar EMC-a. Dodatno, utvrđeno je da je za funkciju proteina važniji tip kolagen vezujućih domena prisutnih u proteinu u odnosu na njihov broj.
7. Uklanjanje određenih domena AggLb proteina dovodi do promene funkcije proteina iz obezbeđivanja ćelijama formiranje agregata u formiranje biofilma. Najverovatnije uklanjanjem dominantnih domena drugi domeni bivaju demaskirani i preuzimaju funkciju formiranja biofilma.

## **7. LITERATURA**

---

## 7. LITERATURA

- Ahmed, S., Meghji, S., Williams, R.J., Henderson, B., Brock, J.H., Nair, S.P. 2001. *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect. Immun.* 69: 2872-2877.
- Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A.M.A., Takagi, A., Koga, Y. 1998. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol.* 93: 2097-2101.
- Aleljung, P., Paulsson, M., Emody, L., Andersson, M., Naidu, A.S., Wadstrom, T. 1991. Collagen binding by lactobacilli. *Curr. Microbiol.* 23: 33-38.
- Aleljung, P., Shen, W., Rozalska, B., Hellman, U., Ljungh, A., Wadstrom, T. 1994. Purification of collagen-binding proteins of *Lactobacillus reuteri* NCIB 11951. *Curr. Microbiol.* 28: 231-236.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Anderson, D.G. McKay, L.L. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 549-552.
- Andersson, H., Asp, N.G., Bruce, A., Roos, S., Wadstrom, T., Wold, A.E. 2001. Health effects of probiotics and prebiotics: A literature review on human studies. *Scand J. Nutr.* 45: 58-75.
- Aslim, B., Onal, D., Beyatli, Y. 2007. Factors influencing autoaggregation and aggregation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolated from handmade yogurt. *J. Food Prot.* 70: 223-227.
- Avall-Jaaskelainen, S., Palva, A. 2005. *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 511-529.

- Bath, K., Roos, S., Wall, T., Jonsson, H. 2005. The cell surface of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 highlighted by identification of 126 extracellular proteins from the genome sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 253: 75-82.
- Bernardeau, M., Guguen, M., Vernoux, J.P. 2006. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 487-513.
- Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA-1 binds to cultured human intestinal cell-lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 35: 483-489.
- Boekhorst, J., de Been, M.W.H.J., Kleerebezem, M., Siezen, R.J. 2005. Genome-wide detection and analysis of cell wall-bound proteins with LPxTG-like sorting motifs. *J. Bacteriol.* 187(14): 4928-4934.
- Boekhorst, J., Helmer, Q., Kleerebezem, M., Siezen, R. 2006. Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiol.* 152(19): 273-280.
- Boris, S., Suárez, J.E., Barbés, C. 1997. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *J. Appl. Microbiol.* 83: 413-420.
- Botina, S.G., Koroban, N.V., Klimina, K.M., Glazova, A.A., Zakharevich, N.V., Zinchenko, V.V., Danilenko, V.N. 2010. Genetic diversity of the genus *Lactobacillus* bacteria from the human gastrointestinal microbiome. *Russ. J. Gen.* 46: 1399-1406.
- Boyle, R.J., Tang, M.L. 2006. The role of probiotics in the management of allergic disease. *Clin. Exp. Allergy* 36(5): 568-576.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13(1): 20-26.

- Buck, B.L., Altermann, E., Svingerud, T., Klaenhammer, T.R. 2005. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8344-8351.
- Burns, P., Reinheimer, J., Vinderola, G. 2011. Impact of bile salt adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 200 on its interaction capacity with the gut. *Res. Microbiol.* 162: 782-790.
- Canchaya, C., Claesson, M.J., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., O'Toole, P.W. 2006. Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiol.* 152(Pt 11): 3185-3196.
- Castagliuolo, I., Galeazzi, F., Ferrari, S., Elli, M., Brun, P., Cavaggioni, A., Tormen, D., Sturniolo, G., Morelli, L., Palù, G. 2005. Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. *FEMS Immunol. Medical. Microbiol.* 43: 197-204.
- Cesena, C., Morelli, L., Alander, M., Siljander, T., Tuomola, E., Salminen, S., Mattila-Sandholm, T., Vilpponen-Salmela, T., von Wright, A. 2001. *Lactobacillus crispatus* and its nonaggregating mutant in human colonization trials. *J. Dairy Sci.* 84: 1001-1010.
- Chapot-Chartier, M.P., Kalakauskas, S. 2014. Cell wall structure and function in lactis acid bacteria. *Microl. Cell Fact.* 13(Suppl 1): S9.
- Chen, X., Xu, J., Shuai, J., Chen, J., Zhang, Z., Fang, W. 2007. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 307-312.
- Clavel, T., Haller, D. 2007. Bacteria- and host-derived mechanisms to control intestinal epithelial cell homeostasis: implications for chronic inflammation. *Inflamm. Bowel Dis.* 13(9): 1153-1164.
- Clewell, B.D. 1994. Plasmids in Bacteria. Plenum Publishing corp., New York. Plasmid transfer, p: 431-432.

- Coconnier, M.H., Lievin, V., Bernet-Camard, M.F., Hudault, S., Servin, A.L. 1997. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1046-1052.
- Coenye, T., Vandamme, P. 2003. Extracting phylogenetic information from whole-genome sequencing projects: the lactic acid bacteria as a test case. *Microbiol.* 149(Pt 12): 3507-3517.
- Collado, C., Surono, I., Meriluoto, J., Salminen, S. 2007. Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interaction with pathogens. *J. Food Sci.* 72: 89-93.
- Collins, J.K., Thornton, G., O'Sullivan, G.O. 1998. Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.* 8: 487-490.
- Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C., Gahan, C.G. 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(18): 7617-7621.
- De Windt, W., Gao, H., Krömer, W., Van Damme, P., Dick, J., Mast, J., Boon, N., Zhou, J., Verstraete, W. 2006. AggA is required for aggregation and increased biofilm formation of a hyper-aggregating mutant of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Microbiology.* 152(Pt 3): 721-729.
- Decker, R., Burdelski, C., Zobiak, M., Büttner, H., Franke, G., Christner, M., Sa, K., Zobiak, B., Henke, H.A., Horswill, A.R., Bischoff, M., Bur, S., Hartmann, T., Schaeffer, C.R., Fey, P.D., Rohde, H. 2015. An 18 kDa scaffold protein is critical for *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *PLoS Pathog.* 11(3): e1004735.
- Deivanayagam, C.C., Rich, R.L., Carson, M., Owens, R.T., Danthuluri, S., Bice, T., Höök, M., Narayana, S.V. 2000. Novel fold and assembly of the repetitive B region of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding surface protein. *Structure* 15: 67-78.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., Hols, P. 1999. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 76: 159-184.



- Dellaglio, F., Felis, G.E. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. 2005. In: Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspect. Ed. Tannock G.W. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Drissi, F., Merhej, V., Angelakis, E., Kaoutari, A.E., Carriere, F., Henrissat, B., Raoult, D. 2014. Comparative genomics analysis of *Lactobacillus* species associated with weight gain or weight protection. *Nutr. Diabetes* 4: e109.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeny, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria for human origin: Correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 386S-392S.
- Fang, F., Li, Y., Bumann, M., Raftis, E.J., Casey, P.G., Cooney, J.C., Walsh, M.A., O'Toole, P.W. 2009. Allelic variation of bile salt hydrolase genes in *Lactobacillus salivarius* does not determine bile resistance levels. *J. Bacteriol.* 191: 5743-5757.
- FAO-WHO. 2006. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutritional paper No. 85: 1-50 (ISBN 92-5-105513-0).
- Fimereli, D.K., Tsirigos, K.D., Litou, Z.I., Liakopoulos, T.D., Bagos, P.G., Hamodrakes, S.J. 2012. CW-PRED: a HMM-based method for the classification of cell wall-anchored proteins of Gram-positive bacteria. *Lect. Not. Comp. Sci.* 7297: 285-290.
- Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Mrsa, V., Susković, J. 2005. Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* 98(2): 285-292.
- Furukawa, S. 2015. Studies on formation, control and application of biofilm formed by food related microorganisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79(7): 1050-1056.
- García-Cayuela, T., Korany, A.M., Bustos, I., Gómez de Cadiñanos, L.P., Requena, T., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M.C. 2014. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Res. Int.* 57: 44-50.
- Gasson, M.J. 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154: 1-9.

- Goel, A.K, Dilbaghi, N., Kamboj, D.V., Singh, L. 2006. Probiotics: Microbial therapy for health modulation. *Defence Sci. J.* 56: 513-529.
- Goh, Y.J., Klaenhammer, T.R. 2010. Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(15): 5005-5012.
- Granato, D., Perotti, F., Masserey, I., Rouvet, M., Golliard, M., Servin, A., Brassart, D. 1999. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1071-1077.
- Guarner, F., Schaafsma, G.J. 1998. Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 39: 273-238.
- Gueimonde, M., Jalonen, L., He, F., Hiramatsu, M., Salminen, S. 2006. Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food Res. Int.* 39(2006): 467-471.
- Hammes, W.P., Hertel, C. 2009. Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212<sup>al</sup>. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second edition, Vol Three*, Williams B. Whitman, New York, p. 465-511.
- Hammes, W.P., Vogel, R.F. 1995. The genus *Lactobacillus*. In: *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, vol. 2: 19-54. Edited by B.J.B. Wood and W.H. Holzapel. Blackie Academic & Professional (UK).
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hanahan, D. 1985. *DNA Cloning* (Glover, D.M., ed) IRL Press, Oxford, 1: 109.
- Henriksson, A., Szewzyc, R. and Conway, P. L. 1991. Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 449.
- Holo, H., Nes, I.F. 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3119-3123.

- Holzappel, W.H. 2006. Introduction to prebiotics and probiotics. Probiotics in food safety and human health. P. 1-33. Edited by Taylor and Francis Group, LLC. New York, USA.
- Hopwood, D.A., Bibb, J.M., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, K.M., Smith, C.P., Ward, J.M. Schrempf, H. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Hungin, A.P., Mulligan, C., Pot, B., Whorwell, P., Agreus, L., Fracasso, P., Lionis, C., Mendive, J., de Philippart Foy, J.M., Rubin, G., Winchester, C., de Wit, N. European Society for Primary Care Gastroenterology. 2013. Systematic review: probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms in clinical practice an evidence-based international guide. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 38: 864-886.
- Idoui, T. 2014. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from gizzard of local poultry. *Iran J. Microbiol.* 6(2): 120-126.
- Jankovic, I., Ventura, M., Meylan, V., Rouvet, M., Elli, M., Zink, R. 2003. Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2. *J. Bacteriol.* 185: 3288-3296.
- Jankovic, T., Frece, J., Abram, M., Gobin, I. 2012. Aggregation ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Int. J. Sanit. Eng. Res.* 6(1): 17-22.
- Johnson, B.R., Klaenhammer, T.R. 2014. Impact of genomics on the field of probiotic research: historical perspectives to modern paradigms. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 106: 141-156.
- Jones, M.L., Ganopolsky, J.G., Labbé, A., Prakash, S. 2010. A novel nitric oxide producing probiotic patch and its antimicrobial efficacy: preparation and in vitro analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87(2): 509-516.
- Juárez Tomás, M.S., Wiese, B., Nader-Macías, M.E. 2005. Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294. *J. Appl. Microbiol.* 99(6): 1383-1391.
- Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., von Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P., Satokari, R., Vesterlund, S., Hendrickx, A.P., Lebeer, S., De Keersmaecker, S.C.,

- Vanderleyden, J., Hämäläinen, T., Laukkanen, S., Salovuori, N., Ritari, J., Alatalo, E., Korpela, R., Mattila-Sandholm, T., Lassig, A., Hatakka, K., Kinnunen, K.T., Karjalainen, H., Saxelin, M., Laakso, K., Surakka, A., Palva, A., Salusjärvi, T., Auvinen, P., de Vos, W.M. 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 17193-17198.
- Kaur, I.P., Chopra, K., Saini, A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. Eur. J. Pharm. Sci. 15(1): 1-9.
- Kaushik, J.K, Kumar, A., Duary, R.K., Mohanty, A.K, Grover, S., Batish, V.K. 2009. Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. PLoS One. 4(12):e8099.
- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R.J., Bron, P.A. 2010. The extracellular biology of the lactobacilli. FEMS Microbiol. Rev. 34: 199-230.
- Kleerebezem, M., Hugenholtz, J. 2003. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. Curr. Opin. Biotechnol. 14: 232-237.
- Kmet, V., Lucchini, F. 1997. Aggregation-promoting factor in human vaginal *Lactobacillus* strains. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 19(2): 111-114.
- Kojic, M., Fira, D., Banina, A and Topisirovic, L. 1991. Characterization of the cell-wall-bound proteinase of *Lactobacillus casei* HN14. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1753-1757.
- Kojic, M., Jovcic, B., Strahinic, I., Begovic, J., Lozo, J., Veljovic, K., Topisirovic, L. 2011. Cloning and expression of novel lactococcal aggregation factor from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1. BMC Microbiol. 11: 265.
- Kojic, M., Strahinic, I., Fira, D., Jovcic, B. and Topisirovic, L. 2006. Plasmid content and bacteriocin production by five strains of *Lactococcus lactis* isolated from semi-hard homemade cheese. Can. J. Microbiol. 52: 1110-1120.
- Kolenbrander, P.E. 2000. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. Annu. Rev. Microbiol. 54: 413-439.

- Kolter, R., Greenberg, E.P. 2006. Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature* 441(7091): 300-302.
- Konstantinov, S.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Bruijns, S.C., Singh, S.K., Valence, F., Molle, D., Lortal, S., Altermann, E., Klaenhammer, T.R., van Kooyk, Y. 2008. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 19474-19479.
- Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J., Matosic, S. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* 94: 981-987.
- Kreft, B., Marre, R., Schramm, U., Wirth, R. 1992. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect. Immun.* 60(1): 25-30.
- Laan, H., Konings, W.N. 1990. Mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(12): 3101-3106.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lambert, J.M., Bongers, R.S., de Vos, W.M., Kleerebezem, M. 2008. Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4719-4726.
- Lebeer, S., Claes, I.J.J., Verhoeven, T.L.A., Vanderleyden, J., de Keersmaecker, S.C.J. 2011. Exopolysaccharides of *Lactobacillus rhamnosus* GG form a protective shield against innate immune factors in the intestine. *Microb. Biotechnol.* 4: 368-374.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C. 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72: 728-764.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L., Perea, M., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C. 2007. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6768-6775.

- Leccese Terraf, M.C, Juárez Tomás, M.S., Rault, L., Le Loir, Y., Even, S., Nader-Macías, M.E. 2016. Biofilms of vaginal *Lactobacillus reuteri* CRL 1324 and *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1332: kinetics of formation and matrix characterization. Arch. Microbiol. 198(7): 689-700.
- Lee, Y.K. Puong, K.Y. 2002. Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in the presence of carbohydrate. Br. J. Nutr. 88 (Suppl. 1), S101-S108.
- Lee, Y.K., Puong, K.Y., Ouwehand, A.C. and Salminen, S. 2003. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. J. Med. Microbiol. 52: 925-930.
- Lee, Y.K., Salminen, S. 1995. The coming age of probiotics. Trends Food Sci. Technol. 6: 241-245.
- Lepanto, P., Lecumberry, F., Rossello, J., Kierbel, A. 2014. A confocal microscopy image analysis method to measure adhesion and internalization of *Pseudomonas aeruginosa* multicellular structures into epithelial cells. Mol. Cell Probes 28(2014): 1-5.
- Li, X.J., Yue, L.Y., Guan, X.F., Qiao, S.Y. 2008. The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus. J. Appl. Microbiol. 104(4):1082-1091.
- Liong, M.T. 2006. *In vivo* and *in vitro* cholesterol removal by lactobacilli and *Bifidobacterium*, PhD thesis, Victoria University, Melbourne, Australia.
- Liong, M.T. 2008. Safety of probiotics: translocation and infection. Nutr. Rev. 66(4): 192-202.
- Ljung, A., Wadstron, T. 2009. *Lactobacillus* molecular biology: from genomics to probiotics. Publisher: Caister Academic Press. Editors: Asa Ljung and Torkel Wadstrom. Lund University, Faculty of Medicine, Sweden.
- Lorca, G., Torino, M.I., Font de Valdez, G., Ljungh, A.A. 2002. Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. FEMS Microbiol. Lett. 206: 31-37.

- Lozo, J., Jovicic, B., Kojic, M., Dalgalarondo, M., Chobert, J.M., Haertlé, T., Topisirovic, L. 2007. Molecular characterization of a novel bacteriocin and an unusually large aggregation factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, a natural isolate from homemade cheese. *Curr. Microbiol.* 55: 266-271.
- Mack, D.R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., Hollingsworth, M.A. 1999. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol.* 276(4 Pt 1): G941-50.
- MacKenzie, D.A., Jeffers, F., Parker, M.L., Vibet-Vallet, A., Bongaerts, R.J., Roos, S., Walter, J., Juge, N. 2010. Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol.* 156(11): 3368-3378.
- Malik, S., Petrova, M.I., Claes, I.J., Verhoeven, T.L., Busschaert, P., Vaneechoutte, M., Lievens, B., Lambrichts, I., Siezen, R.J., Balzarini, J., Vanderleyden, J., Lebeer, S. 2013. The highly autoaggregative and adhesive phenotype of the vaginal *Lactobacillus plantarum* strain CMPG5300 is sortase dependent. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(15): 4576-4585.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Marchant, S., Brailsford, S.R., Twomey, A.C., Roberts, G.J., Beighton, D. 2001. The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res.* 35(6): 397-406.
- Marraffini, L.A., Dedent, A.C., Schneewind, O. 2006. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 192-221.
- Mathara, J.M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C., Kutima, P.M., Mbugua, S.K., Shin, H.K., Holzapfel, W.H. 2008. Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 57-64.

- Mattar, A.F., Teitelbaum, D.H., Drongowski, R.A., Yongyi, F., Harmon, C.M., Coran, A.G. 2002. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatr. Surg. Int.* 18(7): 586-590.
- Mayra-Makinen, A., Bigret, M. 1998. Industrial use and production of lactic acid bacteria. lactic acid bacteria. microbiology and functional aspects, second edition. Edited by Salminen, S., von Wright, A. III Series: Food science and technology Marcel Dekker, USA. p: 73-102.
- McGrady, J.A., Butcher, W.G., Beighton, D., Switalski, L.M. 1995. Specific and charge interactions mediate collagen recognition by oral lactobacilli. *J. Dent. Res.* 74(2): 649-57.
- McKay, L.L., Baldwin, K.A. 1990. Application for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 3-14.
- Michetti, P., Dorta, G., Wiesel, P.H., Brassart, D., Verdu, E., Herranz, M., Felley, C., Porta, N., Rouvet, M., Blum, A.L., Corthésy-Theulaz, I. 1999. Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus (johnsonii)* La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion* 60(3): 203-209.
- Muñoz-Provencio, D., Liopis, M., Antolin, M., de Torres, I., Guarner, F., Perez-Martinez, G., Monedero, V. 2009. Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strain to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. *Arch. Microbiol.* 191: 153-161.
- Muñoz-Provencio, D., Pérez-Martínez, G., Monedero, V. 2010. Characterization of a fibronectin-binding protein from *Lactobacillus casei* BL23. *J. Appl. Microbiol.* 108(3):1050-1059.
- Naruszewicz, M., Johansson, M.J., Zapolska-Downar, D., Bukowska, H. 2002. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 1249-1255.
- Navarre, W.W., Schneewind, O. 1999. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 174-229.



- Neish, A.S., Gewirtz, A.T., Zeng, H. 2000. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science* 289: 1560-1563.
- Ng, S.C., Hart, A.L., Kamm, M.A., Stagg, A.J., Knight, S.C. 2009. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm. Bowel Dis.* 15: 300-310.
- Niedergang, F., Sirard, J.C., Blanc, C.T., Kraehenbuhl, J.P. 2000. Entry and survival of *Salmonella typhimurium* in dendritic cells and presentation of recombinant antigens do not require macrophage-specific virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 14650-14655.
- Nikolic, M., Jovicic, B., Kojic, M., Topisirovic, L. 2010. Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. *Eur. Food Res. Technol.* 231: 925-931.
- Nivoliez, A., Veisseire, P., Alaterre, E., Dausset, C., Baptiste, F., Camarès, O., Paquet-Gachinat, M., Bonnet, M., Forestier, C., Bornes, S. 2015. Influence of manufacturing processes on cell surface properties of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35<sup>®</sup>. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99(1): 399-411.
- Nowak, A., Libudzist, Z. 2009. Ability of probiotic *Lactobacillus casei* DN 114001 to bind or/and metabolize heterocyclic aromatic amines *in vitro*. *Eur. J. Nutr.* 48: 419-427.
- Nueno-Palop, C., Narbad, A. 2011. Probiotic assessment of *Enterococcus faecalis* CP58 isolated from human gut. *Int. J. Food Microbiol.* 145: 390-394.
- O'Donnell, M.M., O'Toole, P.W., Ross, R.P. 2013. Catabolic flexibility of mammalian-associated lactobacilli. *Microb. Cell Fact.* 12: 48.
- O'Toole, P.W., Cooney, J.C. 2008. Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. *Interdiscip. Perspec. Infect. Dis.* 2008: 175285 (9 pages).
- Ocaña, V., Nader-Macías, M.E. 2002. Vaginal lactobacilli: self- and co-aggregation ability. *Br. J. Biomed Sci.* 59: 183-190.
- Oishi, K., Sato, T., Yokoi, W., Yoshida, Y., Ito, M., Sawada, H. 2008. Effect of probiotics, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus casei*, on bisphenol A exposure in rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* 72: 1409-1415.

- O'Sullivan, D.J., Klaenhammer, T.R. 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* ssp. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2730-2733.
- Ouwehand, A.C., Conway, P.L. 1996. Purification and characterization of a component produced by *Lactobacillus fermentum* that inhibits the adhesion of K88 expressing *E. coli* to porcine ileal mucus. J. Appl. Microbiol. 80: 311-318.
- Parvez, S., Malik, K A., Ah Kang, S., Kim, H.Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. J. Appl. Microbiol. 100: 1171-1185.
- Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P., Bellon-Fontaine, M.N. 1997. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. Appl. Environ. Microbiol. 63(5): 1725-1731.
- Pereira, A.I.D., Gibson, R.G. 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. Appl. Environ. Microbiol. 68: 4689-4693.
- Peter, A., Zacharia, S., Mathew, J. 2013. Biofilm formation in enterococci from different source. Int. J. Biopharm 4: 140-144.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat. Methods 8: 785-786.
- Prescott, M.L., Harley, P.J., Klein, A.D. 1999. Microbiology, fourth edition. WCB/McGraw-Hill Companies. Symbiotic Associations: Commensalism, mutualism and normal microbiota of the human body, Chapter 28: 565-579.
- Prince, T., McBain, A.J., O'Neill, C.A. 2012. *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *Staphylococcus aureus* induced cell death by competitive exclusion. Appl. Environ. Microbiol. 78: 5119-5126.
- Rathaningsih, E., Dharmsthiti, S., Krishnapillai, V., Morgan, A., Sinclair, M., Holloway, B.W. 1990. A combined physical and genetic map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J. General Microbiol. 136: 2351-2357.

- Reid, G., Beuerman, D., Heinemann, C., Bruce, A.W. 2001. Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 32: 37-41.
- Reid, G., Cuperus, P.L., Bruce, A.W., van der Mei, H.C., Tomczek, L., Khoury, A.H., Busscher, H.J. 1992. Comparison of contact angles and adhesion to hexadecane of urogenital, dairy, and poultry lactobacilli: effect of serial culture passages. Appl. Environ. Microbiol. 58(5):1549-53.
- Reid, G., Mc Groarty, J.A., Domingue, P.A.G., Chow, A.W., Bruce, A.W., Eisen, A., Costerton, J.W. 1990. Coaggregation of urogenital bacteria *in vitro* and *in vivo*. Curr. Microbiol. 20: 47-52.
- Rhem, M.N., Lech, E.M., Patti, J.M., McDevitt, D., Höök, M., Jones, D.B., Wilhelmus, K.R. 2000. The collagen-binding adhesion is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* keratitis. Infect Immun. 68(6): 3776-3779.
- Rickard, A.H., Gilbert, P., High, N.J., Kolenbrander, P.E., Handley, P.S. 2003. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. Trends Microbiol. 11(2): 94-100.
- Rönnqvist, D., Forsgren-Brusk, U., Husmark, U., Grahn-Hakansson, E. 2007. *Lactobacillus fermentum* Ess-1 with unique growth inhibition of vulvo-vaginal candidiasis pathogens. J. Med. Microbiol. 56(Pt 11): 1500-1504.
- Rook, G.A.W., Brunet, L.R. 2005. Microbes, immunoregulation, and the gut. Gut 54: 317-320.
- Roos, S., Lindgren, S., Jonsson, H. 1999. Autoaggregation of *Lactobacillus reuteri* is mediated by a putative DEAD-box helicase. Mol. Microbiol. 32: 427-436.
- Round, J.L., Mazmanian, S.K. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nat. Rev. Immunol. 9: 313-323.
- Roussel, Y., Colmin, C., Simonet, J.M., Decaris, B. 1993. Strain characterization genome size and plasmid content in the *Lactobacillus acidophilus* group. J. Appl. Bacteriol. 74: 549-556.

- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C.G., Salminen, S. 2006. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J. Food Prot.* 69: 2011-2015.
- Saito, T. 2004. Selection of useful lactic acid bacteria from *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods. *Anim. Sci. J.* 75: 1-13.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Mattila-Sandholm, T. 1998. Demonstration of safety of probiotics -A review. *Int. J. Food Microbiol.* 44: 93-106.
- Sánchez, B., Bressollier, P., Urdaci, M.C. 2008. Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 54: 1-17.
- Sanders, M.E., Guarner, F., Guerrant, R., Holt, P.R., Quigley, E.M., Sartor, R.B., Sherman, P.M., Mayer, E.A. 2013. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut* 62: 787-796.
- Saxelin, M. 1997. *Lactobacillus* GG: a human probiotic strain with thorough clinical documentation. *Food Rev. Int.* 13: 293-313.
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., Black, R.E. 2006. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet. Infect. Dis.* 6(6): 374-382.
- Schachtsiek, M., Hammes, W.P., Hertel, C. 2004. Characterization of *Lactobacillus cornyformis* DSM 20001<sup>T</sup> surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7078-7085.
- Schär-Zammaretti, P., Dillmann, M.L., D'Amico, N., Affolter, M., Ubbnik, J. 2005. Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8165-8173.

- Schär-Zammaretti, P., Ubbnik, J. 2003. The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophysical J.* 85: 4076-4092.
- Schroeder, K., Jularic, M., Horsburgh, S.M., Hirschhausen, N., Neumann, C., Bertling, A., Schulte, A., Foster, S., Kehrel, B.E., Peters, G., Heilmann, C. 2009. Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. *PLoS One* 4: e7567.
- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., Roy, N.C. 2013. The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm.* 2013: 237921.
- Servin, A.L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 405-440.
- Sikorska, H., Smoragiewicz, W. 2013. Role of probiotics in the prevention and treatment of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Intern. J. Antimicrob. Agents.* 42: 475-481.
- Sillanpaa, J., Martínez, B., Antikainen, J., Toba, T., Kalkkinen, N., Tankka, S., Lounatmaa, K., Keränen, J., Höök, M., Westerlund-Wikström, B., Pouwels, P.H., Korhonen, T.K. 2000. Characterization of the collagen-binding S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. *J. Bacteriol.* 182: 6440-6450.
- Smits, H.H., Engering, A., van der Kleij, D., de Jong, E.C., Schipper, K., van Capel, T.M., Zaat, B.A., Yazdanbakhsh, M., Wierenga, E.A., van Kooyk, Y., Kapsenberg, M.L. 2005. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells *in vitro* by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115: 1260-1267.
- Söderling, E.M., Marttinen, A.M., Haukioja, A.L. 2011. Probiotic lactobacilli interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation *in vitro*. *Curr. Microbiol.* 62: 618-622.
- Song, H.J., Kim, J.Y., Jung, S.A., Kim, S.E., Park, H.S., Jeong, Y., Hong, S.P., Cheon, J.H., Kim, W.H., Kim, H.J., Ye, B.D., Yang, S.K., Kim, S.W., Shin, S.J., Kim, H.S., Sung, J.K., Kim, E.Y. 2010. Effect of probiotic *Lactobacillus* (Lacidofil® cap) for the

- prevention of antibiotic-associated diarrhea: a prospective, randomized, double-blind, multicenter study. *J. Korean Med. Sci.* 25(12): 1784-1791.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Spanhaak, S., Havenaar, R., Schaafsma, G. 1998. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52: 899-907.
- Spirig, T., Weiner, E.M., Clubb, R.T. 2011. Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 82(5): 1044-1059.
- Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 70: 331-345.
- Styriak, I., Demeckova, B., Zatkovic B., Kmet, V. 2001. Collagen binding by vaginal aggregative lactobacilli. *Vet. Med. Czech* 46(4): 89-94.
- Styriak, I., Nemcova, R., Chang Y.H., Ljungh, A. 2003. Binding of extracellular matrix molecules by probiotic bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 37. 329-333.
- Sutcliffe, I.C., Harrington, D.J. 2002. Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiol.* 148: 2065-2077.
- Taglialegna, A., Navarro, S., Ventura, S., Garnett, J.A., Matthews, S., Penades, J.R., Lasa, I., Valle, J. 2016. Staphylococcal Bap proteins build amyloid scaffold biofilm matrices in response to environmental signals. *PLoS Pathog.* 12(6), e1005711.
- Tareb, R., Bernardeau, M., Horvath, P., Vernoux, J.P. 2015. Rough and smooth morphotypes isolated from *Lactobacillus farciminis* CNCM I-3699 are two closely-related variants. *Int. J. Food Microbiol.* 193: 82-90.
- Tolinački, M. 2012. Korelacija prisustva bakteriocinskih gena i proizvodnje bakteriocina prirodnih izolata *Lactobacillus casei/paracasei* grupe. Doktorska disertacija. Biološki fakultet. Univerzitet u Beogradu.

- Tripathi, P., Beaussart, A., Alsteens, D., Dupres, V., Claes, I., von Ossowski, I., de Vos, W.M., Palva, A., Lebeer, S., Vanderleyden, J., Dufrêne, Y.F. 2013. Adhesion and nanomechanics of pili from the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. ACS Nano. 7(4): 3685-3697.
- Tsuda, H., Hara, K., Miyamoto, T. 2008. Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* mutant strain 301102S. J. Dairy Sci. 91: 2960-2966.
- Turpin, W., Humblot, C., Noordine, M.L., Wrzosek, L., Tomas, J., Mayeur, C., Cherbuy, C., Guyot, J.P., Thomas, M. 2013. Behavior of lactobacilli isolated from fermented slurry (ben-saalga) in gnotobiotic rats. PLoS One 8: e57711.
- Usman, H.A. 1999. Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. J. Dairy Sci. 82: 243-248.
- Uzelac, G., Miljkovic, M., Lozo, J., Radulovic, Z., Tosic, N., Kojic, M. 2015. Expression of bacteriocin LsbB is dependent on a transcription terminator. Microbiol. Res. 179: 45-53.
- Valenzuela, A.S., ben Omar, N., Abriouel, H., López, R.L., Veljovic, K., Cañamero, M.M., Kojic, M., Topisirovic L., Gálvez, A. 2009. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. Food Control 20: 381-385.
- Vásquez, A., Jakobsson, T., Ahrné, S., Forsum, U., Molin, G. 2002. Vaginal lactobacillus flora of healthy Swedish women. J. Clin. Microbiol. 40(8): 2746-2749.
- Veljovic, K., Terzic-Vidojevic, A., Vukasinovic, M., Strahinic, I., Begovic, J., Lozo, J., Ostojic, M., Topisirovic, L. 2007. Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. J. Appl. Microbiol 103: 2142-2152.
- Ventura, M., Jankovic, I., Walker, C.D., Pridmore, R.D. and Zink, R. 2002. Identification and characterization of novel surface proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasseri*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 6172-6181.

- Vesterlund, S., Karp, M., Salminen, S., Ouwehand, A.C. 2006. *Staphylococcus aureus* adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. *Microbiol.* 152: 1819-1826.
- Voltan, S., Castagliuolo, I., Elli, M., Longo, S., Brun, P., D'Inca, R., Porzionato, A., Macchi, V., Palù, G., Sturniolo, G.C., Morelli, L., Martines, D. 2007. Aggregating phenotype in *Lactobacillus crispatus* determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa. *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 1138-1148.
- Von Ossowski, I., Satokari, E., Reunanen, J., Lebeer, S., De Keersmaecker, A.C.J., Vanderleyden, J., de Vos, W.M., Palva, A. 2011. Functional characterization of a mucus specific LPXTG surface adhesion from probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(13): 4465-4472.
- Walencka, E., Różalska, S., Sadowska, B., Różalska, B. 2008. The influence of *Lactobacillus acidophilus* derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol. (Praha).* 53: 61-66.
- Walker, D.C., Aoyama, K., Klaenhammer, T.R. 1996. Electrotransformation of *Lactobacillus acidophilus* A1. *FEMS Microbiol. Lett.* 138: 233-237.
- Walter, J., Loach, D.M., Alqumber, M., Rockel, C., Hermann, C., Pfitzenmaier, M., Tannock, G.W. 2007. D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Environ. Microbiol.* 9: 1750-1760.
- Walter, J., Schwab, C., Loach, D. M., Gänzle, M. G. Tannock, G. W. 2008. Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiol.* 154: 72-80.
- Waśko A, Polak-Berecka M, Paduch R, Józwiak K. 2014. The effect of moonlighting proteins on the adhesion and aggregation ability of *Lactobacillus helveticus*. *Anaerobe* 30C: 161-168.
- Wynne, A.G., Gibson, G.R., Brostoff, J. 2006. Composition comprising a *Lactobacillus pentosus* strain and uses thereof. USA Patent 7125708 B2.



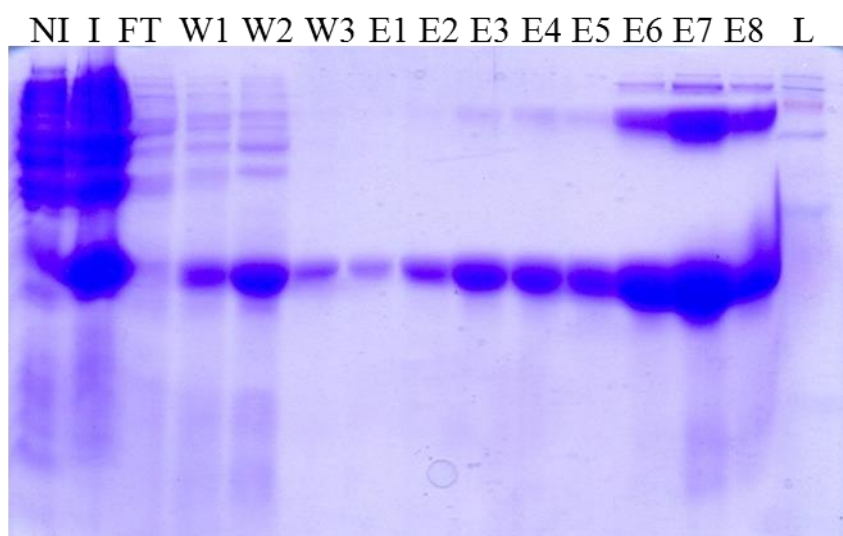
- Yan, F., Polk, D.B. .2002. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 277: 50959-50965.
- Yang, Z., Li, S., Zhang, X., Zeng, X., Li, D., Zhao, Y., Zhang, J. 2010. Capsular and slime-polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: Potential application in fermented milk products. *J. Biosci. Bioeng.* 110: 53-57.
- Yasuda, E., Serata, M. Sako, T. 2008. Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain Shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4746-4755.
- Younes, J.A., van der Mei, H.C., van den Heuvel, E., Busscher, H.J., Reid, G. 2012. Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli. *PLoS One* 7: e36917.
- Zárate, G., Santos, V., Nader-Macias, M.E. 2007. Protective effect of vaginal *Lactobacillus paracasei* CRL1289 against urogenital infection produced by *Staphylococcus aureus* in a mouse animal model. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2007: 48358.
- Zielińska, D., Rzepkowska, A., Radawska, A., Zieliński, K. 2015. *In vitro* screening of selected probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber. *Curr. Microbiol.* 70(2): 183-194.

# **PRILOZI**

## PRILOZI

## Prilog 1

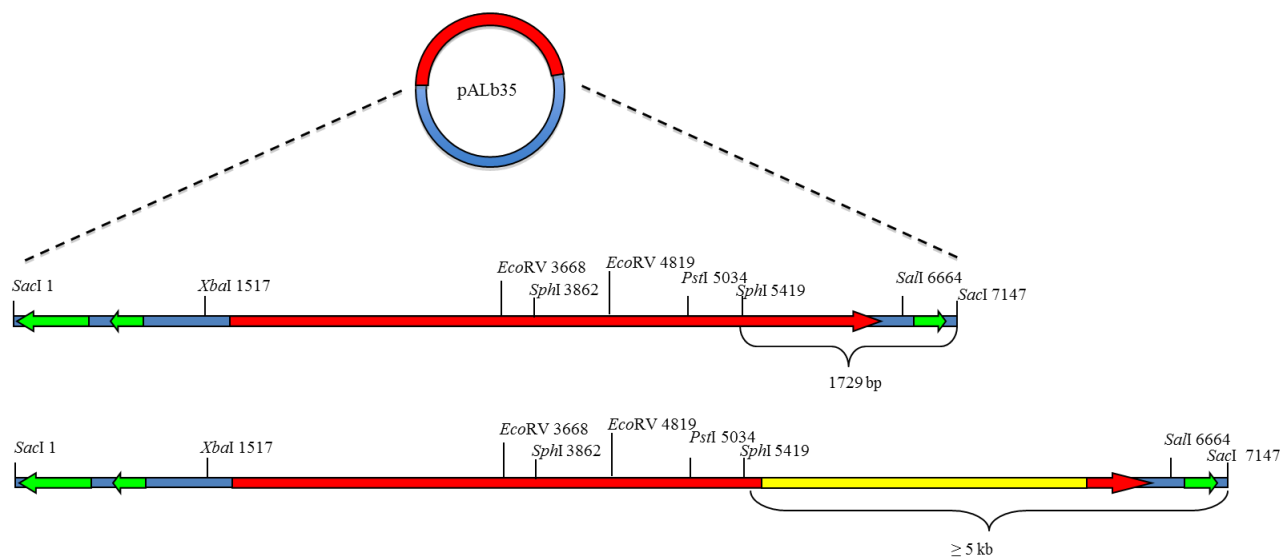
Izolacija i prečišćavanje AggBS-His<sub>6</sub> rekombinantnog proteina u denaturišućim uslovima



**Prilog 1.** SDS-PAGE proteina uzoraka iz svih faza izolacije i prečišćavanja AggBS-His<sub>6</sub> rekombinantnog proteina u denaturišućim uslovima: NI - neindukovana kultura; I - indukovana kultura; FT - flow through; W1, W2 i W3 - ispiranje kolone puferom C; E1, E2, E3 i E4 - ispiranje kolone puferom D; E5, E6, E7 i E8 - ispiranje kolone puferom E; L - proteinski marker (PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder).

## Prilog 2

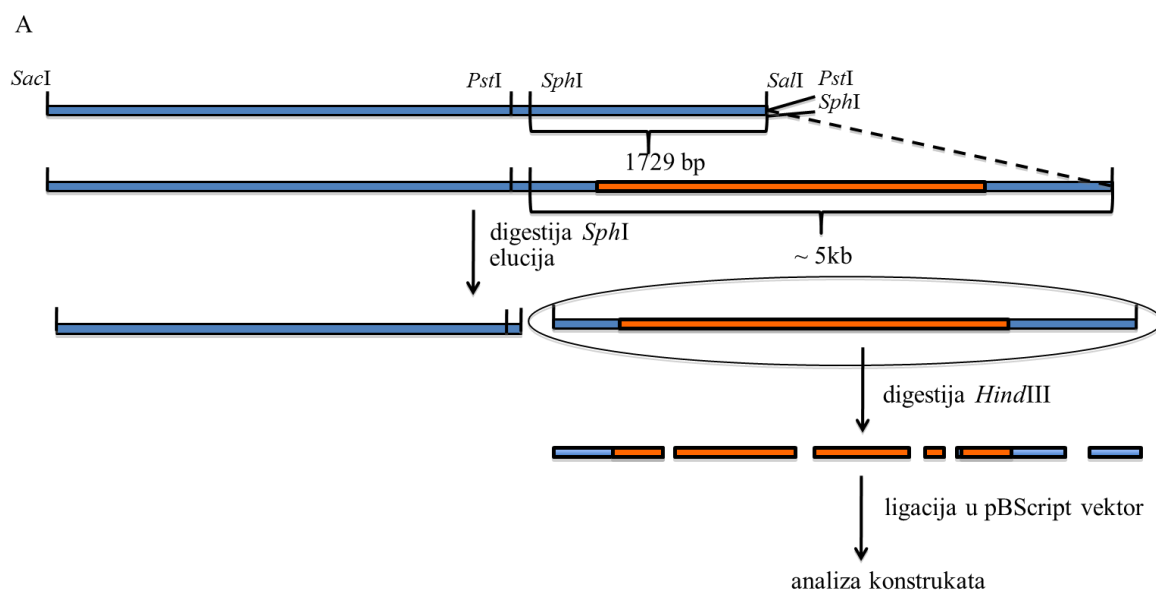
Shematski prikaz pretpostavljenog nepoznatog regiona sekvence u okviru konstrukta pALb35



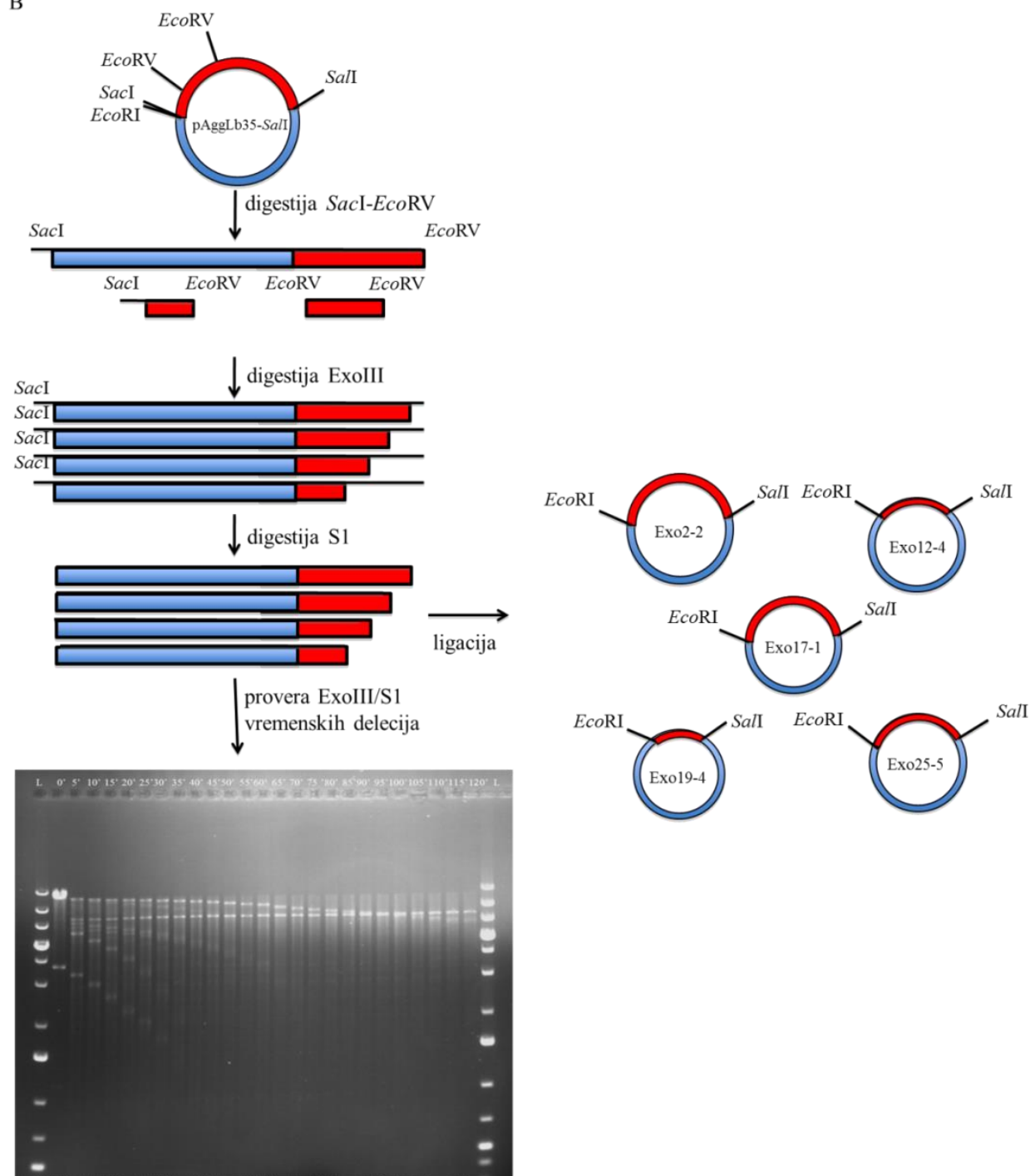
Prilog 2. Shematski prikaz pretpostavljenog nepoznatog regiona sekvence u okviru konstrukta pALb35.

## Prilog 3

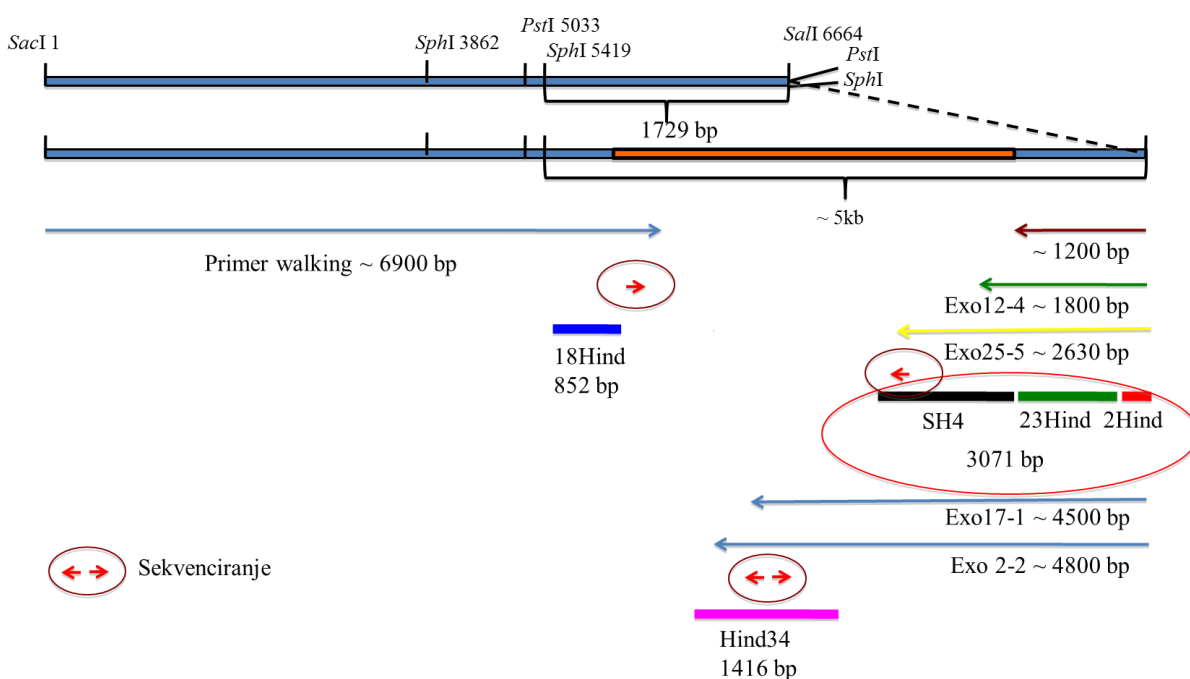
Shematski prikaz strategija subkloniranja nepoznatog regiona sekvence u okviru konstrukta pALb35



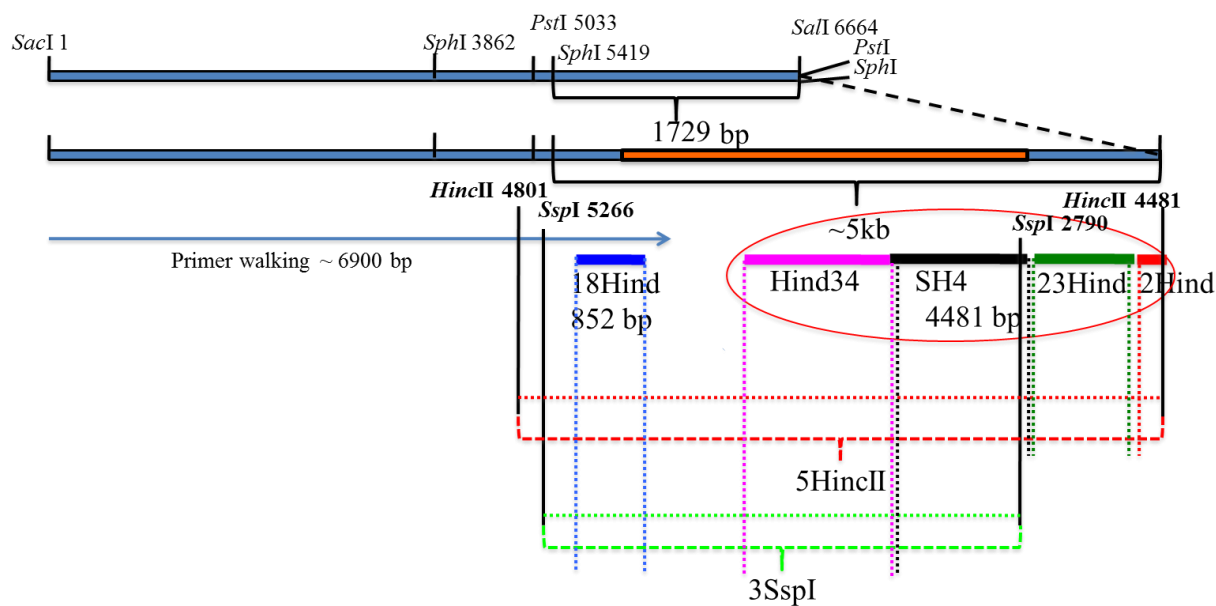
B



C



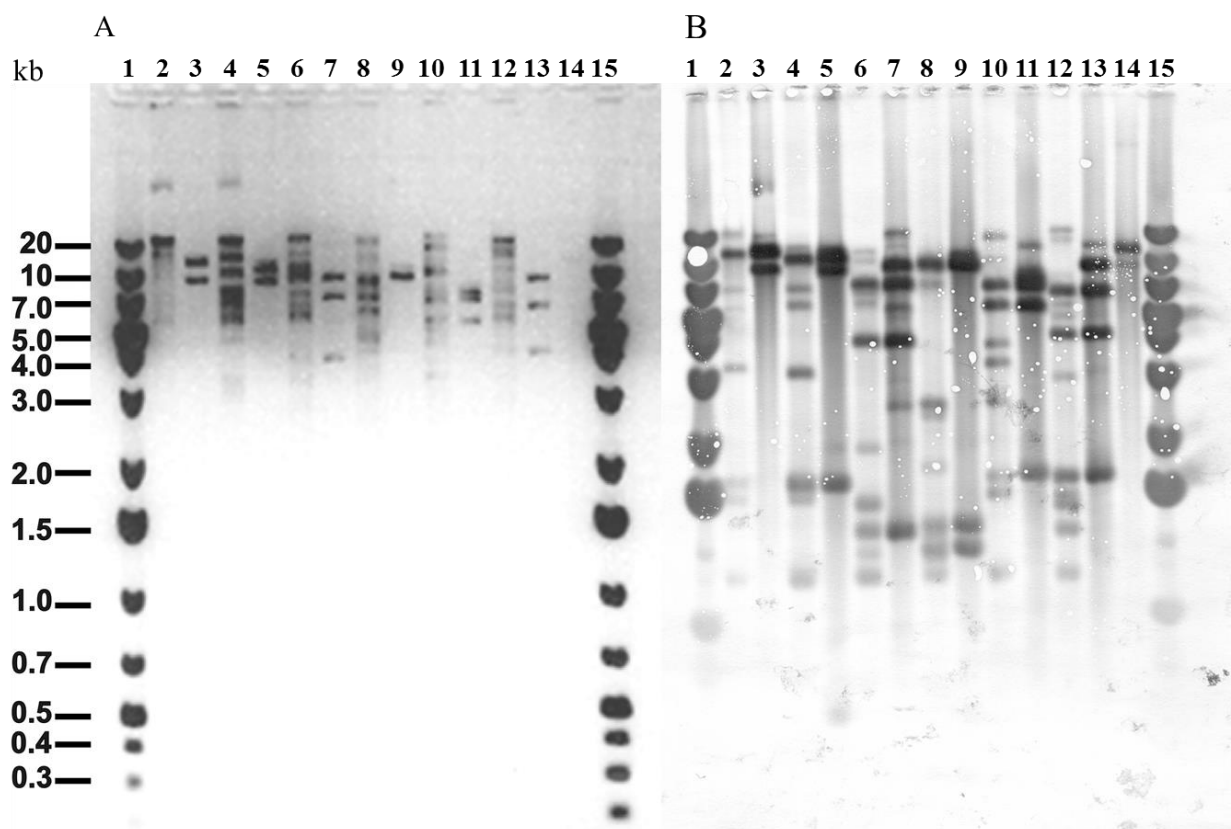
D



**Prilog 3.** Shematski prikaz primenjenih strategija subkloniranja nepoznatog regiona sekvence u okviru konstrukta pALb35. (A) subkloniranje svih *HindIII* fragmenata unutar konstrukta pALb35, a koji se nalaze u okviru jednog od *SphI* fragmenata; (B) vremenski determinisana deleciona biblioteka koristeći tretman enzimima: ExoIII i S1 nukleaza; (C) i (D) ujedinjeni prikaz svih konstrukata dobijenih primenom korišćenih pristupa za preklapanje celokupne nepoznate sekvence u okviru konstrukta pALb35.

## Prilog 4

## DNK-DNK hibridizacija

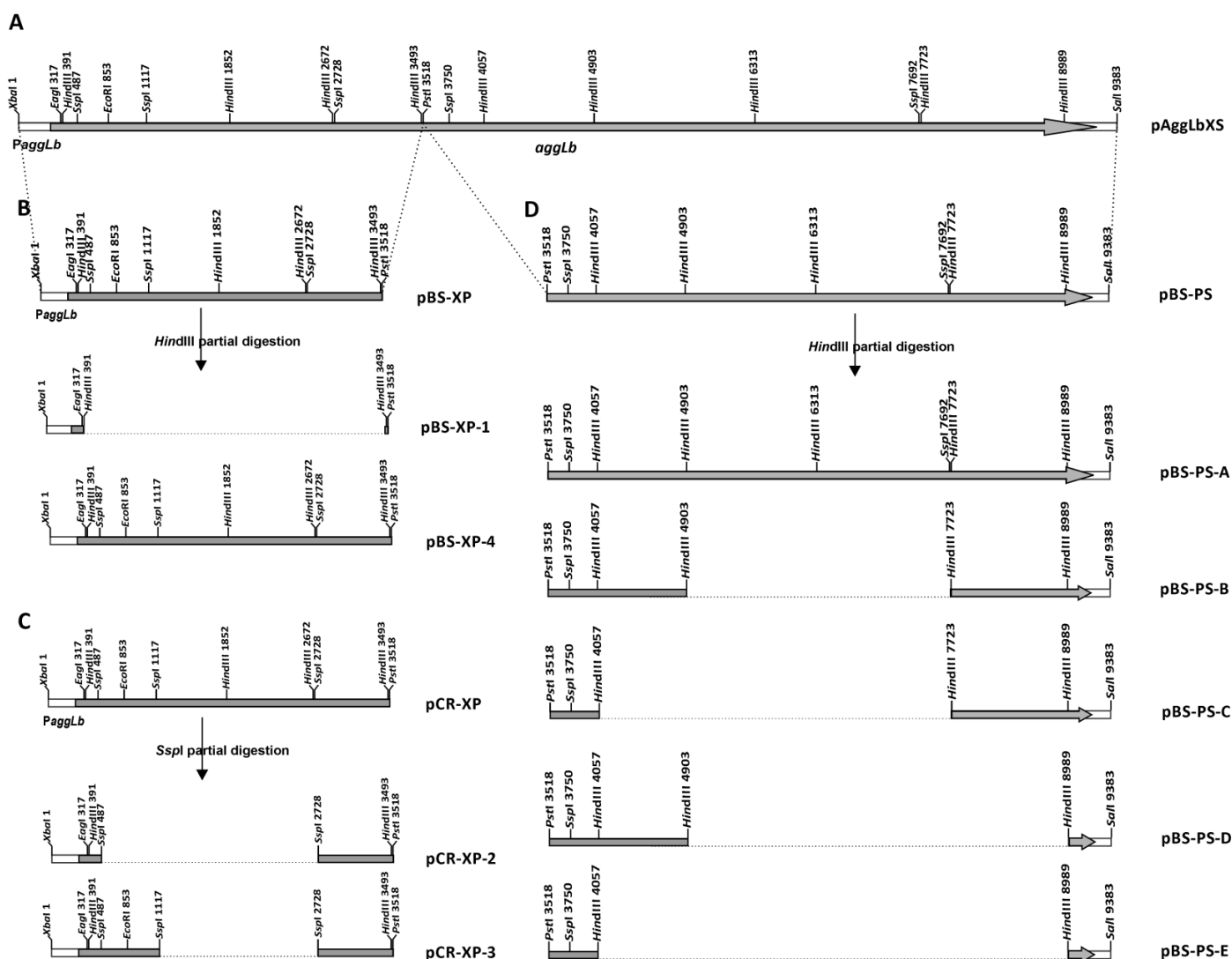


**Prilog 4.** DNK-DNK hibridizacija. (A) Elektroforeza plazmidne DNK soja BGNJ1-64 (2, 4, 6, 8, 10 i 12) i konstrukta pALb35 (3, 5, 7, 9, 11 i 13), sečene restrikcijom enzimima: *SacI* (2 i 3), *XbaI* (4 i 5), *EcoRV* (6 i 7), *EcoRI* (8 i 9), *PstI* (10 i 11) i *SphI* (12 i 13); (B) Membrana posle hibridizacije; pALb35 konstrukt korišćen kao proba (14 - pozitivna kontrola). 1 i 15 - marker (GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder).



## Prilog 5

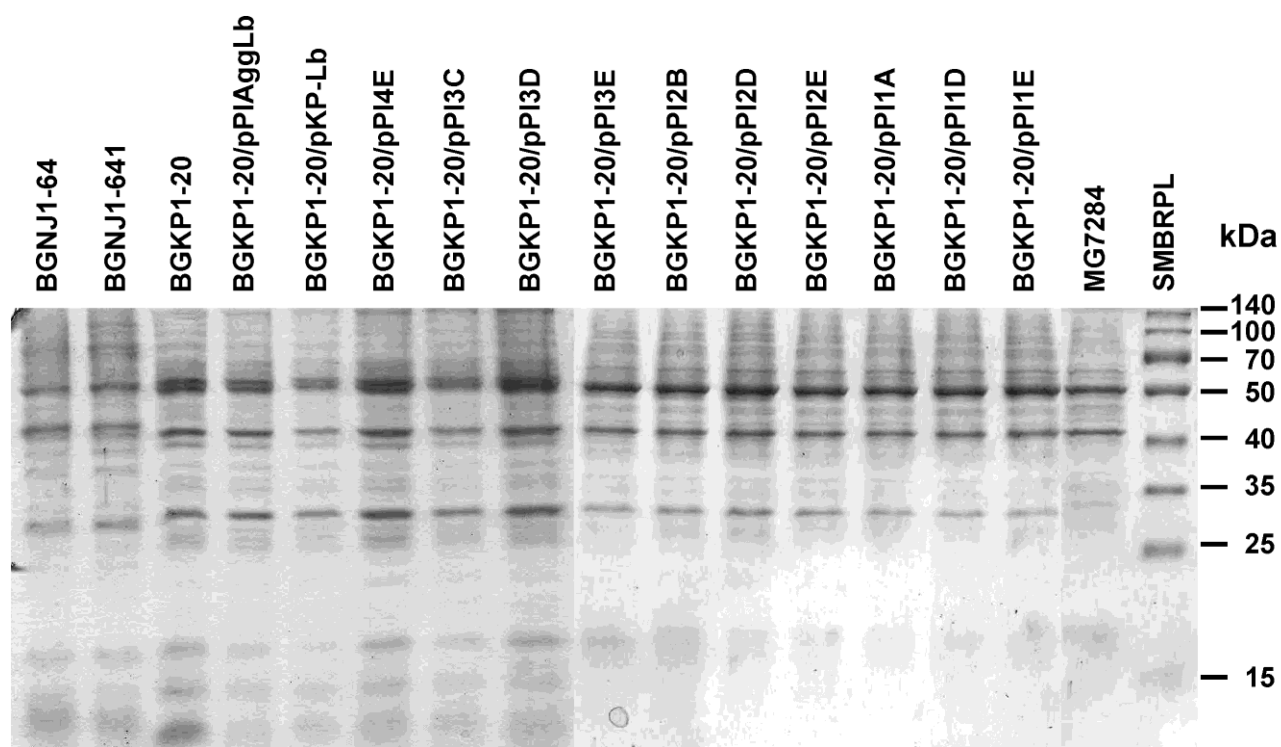
## Genetičke manipulacije u cilju konstrukcije varijanti AggLb proteina



**Prilog 5.** Shematski prikaz strategije konstrukcije varijanti *aggLb* gena. (A) *aggLb* gen i njegova okolina; (B) *XbaI-PstI* fragment *aggLb* gena kloniran u pBlueScript vektoru, pBS-XP-1 i pBS-XP-4 konstrukti dobijeni *HindIII* parcijalnom digestijom; (C) *XbaI-PstI* fragment *aggLb* gena kloniran u pCR2.1-TOPO vektoru, pBS-XP-2 i pBS-XP-3 konstrukti dobijeni *SspI* parcijalnom digestijom; (D) *PstI-SalI* fragment *aggLb* gena kloniran u pBlueScript vektoru, pBS-PS-A, pBS-PS-B, pBS-PS-C, pBS-PS-D i pBS-PS-E konstrukti dobijeni *HindIII* parcijalnom digestijom.

## Prilog 6

SDS-PAGE proteina – kontrola ujednačenosti količine proteina nanetih na membranu za Dot-blot analizu



**Prilog 6.** SDS-PAGE totalnih proteina derivata koji na površini ekspimiraju varijante AggLb proteina i odgovarajućih kontrola. SMBRPL - marker (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder).

---

## Biografija autora

**Marija S. Miljković** je rođena 27. 10. 1988. godine u Leskovcu, Srbija. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Biologija upisala je 2007. godine, a osnovne akademske studije završila je 2010. godine. Master akademske studije upisala je iste godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija. Master studije završila je 2012. godine odbranom master rada pod nazivom „Uloga polisaharida u probiotičkom potencijalu soja *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8“ koji je uradila u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju (tada, Laboratorija za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama), Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Godine 2012. upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija prokariota. Marija Miljković je izradu doktorske teze otpočela u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, na projektu Osnovnih Istraživanja-Biologija OI 173019 “Izučavanje gena i molekularnih mehanizama u osnovi probiotičke aktivnosti bakterija mlečne kiseline izolovanih sa područja zapadnog balkana”. Takođe, učesnik je projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja III 46010 “Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti”.

Od 1. oktobra 2013. godine, Marija Miljković je zaposlena u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju, kao istraživač pripravnik. Odlukom Naučnog veća Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo od 16. januara 2014. godine Marija Miljković je izabrana u zvanje Istraživač saradnik.

U toku dosadašnjeg naučnog rada Marija Miljković je objavila četrnaest (14) radova; osam (8) radova u međunarodnim časopisima M21 kategorije, tri (3) rada u časopisima M22 kategorije, dva (2) rada u časopisima M23 kategorije i jedan (1) rad u časopisu bez impakt faktora. Na međunarodnim kongresima ima sedam (7) saopštenja štampanih u izvodu. Na domaćim simpozijumima ima jedno (1) predavanje po pozivu štampano u celini. Ukupan zbir impakt faktora radova Marije Miljković iznosi 41,966, a ukupan broj heterocitata je 19.

Dobitnik je FEMS stipendije za mlade naučnike u 2015. godini.

Član je Udruženja mikrobiologa Srbije i FEMS-a od 2013. godine.

Прилог А

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марија С. Миљковић

Број индекса М3010/2010

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Карактеризација AggLb агрегационог фактора соја *Lactobacillus paracasei* subsp.

*paracasei* BGNJ1-64

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

Потпис аутора

У Београду, 06.09.2016.

Марија Миљковић

Прилог Б

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија С. Миљковић

Број индекса М3010/2010

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Карактеризација AggLb агрегационог фактора соја *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1/64

Ментор др Милан Којић, научни саветник

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 06.09.2016.

Марија Миљковић

Прилог Ц

## Изјава о коришћењу

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

Карактеризација AggLb агрегационог фактора соја *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 06.09.2016.

Марија Милошевић

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

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

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

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

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

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

RESEARCH ARTICLE

# AggLb Is the Largest Cell-Aggregation Factor from *Lactobacillus paracasei* Subsp. *paracasei* BGNJ1-64, Functions in Collagen Adhesion, and Pathogen Exclusion *In Vitro*

Marija Miljkovic<sup>1</sup>, Ivana Strahinic<sup>1</sup>, Maja Tolinacki<sup>1</sup>, Milica Zivkovic<sup>1</sup>, Snezana Kojic<sup>2</sup>, Natasa Golic<sup>1</sup>, Milan Kojic<sup>1\*</sup>

**1** Laboratory for Molecular Microbiology, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444/a, P.O. Box 23, 11010, Belgrade, Serbia, **2** Laboratory for Molecular Biology, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444/a, P.O. Box 23, 11010, Belgrade, Serbia

\* [mkojic@imgge.bg.ac.rs](mailto:mkojic@imgge.bg.ac.rs)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Miljkovic M, Strahinic I, Tolinacki M, Zivkovic M, Kojic S, Golic N, et al. (2015) AggLb Is the Largest Cell-Aggregation Factor from *Lactobacillus paracasei* Subsp. *paracasei* BGNJ1-64, Functions in Collagen Adhesion, and Pathogen Exclusion *In Vitro*. PLoS ONE 10(5): e0126387. doi:10.1371/journal.pone.0126387

**Academic Editor:** Jose Luis Balcazar, Catalan Institute for Water Research (ICRA), SPAIN

**Received:** January 15, 2015

**Accepted:** April 1, 2015

**Published:** May 8, 2015

**Copyright:** © 2015 Miljkovic et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by OI 173019, Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia, [www.mpd.gov.rs](http://www.mpd.gov.rs), to MK.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Eleven *Lactobacillus* strains with strong aggregation abilities were selected from a laboratory collection. In two of the strains, genes associated with aggregation capability were plasmid located and found to strongly correlate with collagen binding. The gene encoding the auto-aggregation-promoting protein (AggLb) of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 was cloned using a novel, wide-range-host shuttle cloning vector, pAZILSJ. The clone pALb35, containing a 11377-bp DNA fragment, was selected from the SacI plasmid library for its ability to provide carriers with the aggregation phenotype. The complete fragment was sequenced and four potential ORFs were detected, including the *aggLb* gene and three surrounding transposase genes. AggLb is the largest known cell-surface protein in lactobacilli, consisting of 2998 aa (318,611 Da). AggLb belongs to the collagen-binding superfamily and its C-terminal region contains 20 successive repeats that are identical even at the nucleotide level. Deletion of *aggLb* causes a loss of the capacity to form cell aggregates, whereas overexpression increases cellular aggregation, hydrophobicity and collagen-binding potential. PCR screening performed with three sets of primers based on the *aggLb* gene of BGNJ1-64 enabled detection of the same type of *aggLb* gene in five of eleven selected aggregation-positive *Lactobacillus* strains. Heterologous expression of *aggLb* confirmed the crucial role of the AggLb protein in cell aggregation and specific collagen binding, indicating that AggLb has a useful probiotic function in effective colonization of host tissue and prevention of pathogen colonization.



## Introduction

Due to their long history of safe use in food fermentation and preservation, lactobacilli currently carry the ‘Qualified Presumption of Safety’ (QPS) status [1]. Particularly, lactobacilli have attracted attention as probiotic due to beneficial effects on human and animal hosts. According to the FAO/WHO (2006) guidelines for the evaluation of probiotics for human food applications [2], one of the important criteria for probiotic selection is the capability to adhere to the host’s intestinal epithelium. It is believed that adherence ability is important for successful colonization and achievement of favorable effects over a longer period of time. The ability of probiotic bacteria to adhere to epithelial surfaces has been extensively analyzed [3, 4]. The precise mechanisms that affect crosstalk between the microbe and host remain unclear, although there is growing evidence that adherence depends on bacterial cell-surface composition. Probiotic microorganisms express cell-surface adhesins that mediate microbial adhesion to the extracellular matrix (ECM) components of host tissue such as mucin, fibronectin, collagen, laminin or fibrinogen [5]. For example, a 43-kDa collagen-binding S-layer protein has been identified in *Lactobacillus crispatus* [6], and Lorca *et al.* [7] showed that a 15-kDa protein from *Lactobacillus acidophilus* CRL 639 binds fibronectin while two proteins of 45- and 58-kDa interact with collagen. On the other hand, various human pathogenic bacteria also exhibit specific adhesiveness to collagenous proteins [8, 9]. This interaction is critical in early-phase infection, and thus is strongly related to the virulence of the pathogen. Through the action of cell-surface adhesins, pathogens successfully interact with proteins of the ECM, preserving peristalsis and enabling colonization of the tissue and infection [9]. An example is the collagen-binding protein that enables *Staphylococcus aureus* cells to adhere to cartilage *in vitro* [10] and which has been described as a major virulence factor.

Cellular aggregation is defined as ability of cells to form precipitates. Auto-aggregation involves cells of the same bacterial strain, while genetically distant cells co-aggregate [11]. The aggregation phenomenon has primarily been connected with a high frequency of genetic exchange through the easily achieved communication between cells [12]. In lactobacilli, the two types of proteins responsible for manifestation of the aggregation phenomenon are the soluble proteins and the cell-surface proteins [13, 14]. Co-aggregation promoting factors from lactobacilli differ in molecular weight and primary structure [11, 15, 16, 17]. The smallest described protein (2 kDa) mediates self-aggregation and was found in the vaginal isolate *Lactobacillus gasseri* 2459. This protein likely acts as a pheromone-like factor that induces expression of surface proteins that are critical for adhesion [13]. On the other hand, a very large protein (molecular mass > 200 kDa) directly involved in aggregation was described in *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 [18]. In addition to the proteinaceous component, various ions are linked to aggregation in certain lactobacilli strains that have been isolated from cheese [14, 18].

Cell-surface proteins are likely linked to the efficient interaction of probiotic bacteria with ECM proteins. It is possible that this interaction helps the formation of a barrier that inhibits the adherence of pathogens to the intestinal mucosa, thereby preventing pathogenic colonization and ultimately assisting in the removal of pathogens from the intestinal environment. Indeed, the presence of common receptors in different types of bacteria, e.g., *Lactobacillus* and select pathogens, could enable the exclusion of pathogens from the gastrointestinal (GI) and urogenital (UG) tracts by direct competition for binding sites on epithelial cell-surface proteins [19].

This study aimed to investigate the relationship between auto-aggregation, binding to different surfaces and pathogen exclusion *in vitro*, in selected *Lactobacillus* strains from a laboratory collection. The novel *aggLb* gene coding for the auto-aggregation-promoting protein of *Lb*.

**Table 1. List of bacterial strains and plasmids used in the study.**

General characteristics		Source or reference
Strains		
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>		
BGSJ2-8	Agg <sup>+</sup> , Prt <sup>+</sup> , Bac <sup>+</sup>	[18]
BGSJ2-81	Agg <sup>-</sup> , Prt <sup>+</sup> , Bac <sup>+</sup>	[18]
BGAR75	Agg <sup>+</sup> , Prt <sup>+</sup> , Bac <sup>+</sup>	[14]
BGGR2-68	Agg <sup>+</sup>	[14]
BGGR2-82	Agg <sup>+</sup>	[14]
BGDP1-84	Agg <sup>+</sup>	[14]
BGDP9-38	Agg <sup>+</sup> , Prt <sup>+</sup>	This work
BGNJ1-3	Agg <sup>+</sup> , Prt <sup>+</sup>	[14]
BGNJ1-61	Agg <sup>+</sup> , Prt <sup>+</sup> , Bac <sup>+</sup>	[14]
BGNJ1-64	Agg <sup>+</sup> Bac <sup>+</sup>	This work
BGNJ1-641	Agg <sup>-</sup>	This work
BGNJ1-70	Agg <sup>+</sup> , Bac <sup>+</sup>	[14]
BGZLS30-6	Agg <sup>+</sup>	[20]
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		
BGKP1-20	Agg <sup>-</sup>	[21]
BGKP1-20/pALb35	Agg <sup>+</sup> , Em <sup>f</sup>	This work
<i>Enterococcus faecalis</i>		
BGZLS10-27	Agg <sup>-</sup>	[22]
BGZLS10-27/pALb35	Agg <sup>+</sup> , Em <sup>f</sup>	This work
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	F <sup>-</sup> Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>-</sup> ) supE44 thi-1 gyrA relA1	[23]
O157:H7		ATCC35150
<i>Staphylococcus aureus</i>		ATCC25923
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1		Laboratory collection
Plasmids		
pGEM-T Easy Vector	3015 bp, Amp <sup>r</sup> , bacterial, nonviral, transient, constitutive, high expression level	Promega
pAZIL	Em <sup>r</sup> , shuttle cloning vector	[21]
pAZILSJ cloning vector	8589 bp, derivative of pAZIL vector carrying origin of replication and <i>repB</i> gene from plasmid pSJ2-8	This work
pNJ1	~40 kb, natural plasmid of BGNJ1-64 carrying <i>aggLb</i> gene	This work
pALb35	pAZILSJ derivative carrying 11377 bp SacI fragment of pNJ1 plasmid	This work

Amp<sup>r</sup>- resistance to ampicillin; Em<sup>r</sup>- resistance to erythromycin; Bac<sup>+</sup>- bacteriocin producer; Prt<sup>+</sup>- proteolytically active; Agg<sup>+</sup>- aggregation-positive; Agg<sup>-</sup> aggregation-negative.

doi:10.1371/journal.pone.0126387.t001

*paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 was cloned and functionally analyzed. Given the fact that the biological function of the aggregation phenomenon has remained poorly characterized, deciphering the structural characteristics and binding specificity of AggLb is important for improving our understanding of the mechanisms involved in probiotic-host interactions.

## Materials and Methods

### Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains, their derivatives, and the plasmids used in this study are listed in [Table 1](#). *Lactobacillus paracasei* was grown in de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) (Merck GmbH,

Darmstadt, Germany) medium at 30°C. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Enterococcus faecalis* were grown at 30°C in M17 medium (Merck GmbH, Darmstadt, Germany) supplemented with 0.5% glucose (GM17). *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and O157:H7 were grown in Luria-Bertani medium (LB) at 37°C with aeration. Erythromycin was added for a final concentration of 10  $\mu$ g/ml or 300  $\mu$ g/ml for lactic acid bacteria (LAB) and *E. coli*, respectively. Ampicillin was added for a final concentration of 100  $\mu$ g/ml for *E. coli*. When necessary, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-Gal) (Fermentas, Vilnius, Lithuania) was added to LB plates for a final concentration of 40  $\mu$ g/ml for blue/white color selection of colonies.

## Recombinant DNA techniques

The non-aggregating derivatives *L. lactis* subsp. *lactis* BGKP1-20 and *E. faecalis* BGZLS10-27 were used for heterologous expression of aggregation factor. Electrocompetent BGKP1-20 and BGZLS10-27 cells were prepared as described by Holo and Nes [24]. With the exception of *E. coli* DH5 $\alpha$ , which were transformed by heat shock [23], transformations were performed by electroporation using an Eppendorf Electroporator (Eppendorf, Hamburg, Germany). Agar plates with the appropriate antibiotic were used for the selection of transformants.

Plasmid DNA from *E. coli* DH5 $\alpha$  was isolated using a QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The procedure described by O'Sullivan and Klaenhammer was applied for plasmid isolation from lactococci and lactobacilli [25]. Curing experiments were performed as described previously [26]. For cloning experiments, plasmid DNA from lactobacilli was isolated according to methods from Anderson and Mc Kay [27] and separated using CsCl-gradient ultra-centrifugation [28]. Total DNA from pure cultures was extracted by the method described by Hopwood *et al.* [29]. The DNA fragments from agarose gels were purified using a QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Digestion with restriction enzymes HindIII, PstI, SacI, EcoRI, SalI, and BamHI was conducted according to the supplier's instructions (Fermentas, Vilnius, Lithuania). The sequences and localization of the primers used in this study are shown in S1 Table. PCR was carried out in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a final volume of 50  $\mu$ l with 1.25 U of KAPA *Taq* DNA polymerase (Kapa Biosystems, Woburn, USA), 20 ng of genomic DNA, 200  $\mu$ mol dNTPs each (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and 25  $\mu$ mol of each primer. After an initial denaturation step of 5 min at 94°C, the mixture was subjected to 30 cycles of three steps (denaturation at 95°C, annealing at 55°C, and polymerization at 72°C, each for 30 s). A final extension was performed for 7 min at 72°C. PCR products were checked on a 1% (wt/vol) agarose gel that was run at a constant voltage. The ready-to-use GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas) was used as a molecular-weight marker.

Sub-cloning of HindIII, SspI and HincII fragments and deletion experiments with exonuclease III (ExoIII)/S1 enabled sequencing of the repeat-containing *aggLb* gene region. Series of nested deletions of the pALb35 plasmid were obtained by digestion with EcoRV and SacI, which enabled unidirectional ExoIII activity. The resulting DNA was progressively shortened from the EcoRV end by approximately 100 nucleotides per minute. SacI/EcoRV-predigested pALb35 DNA was digested for 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 min with ExoIII at 30°C in the presence of 100 mM NaCl. Resulting deletions ranged from 500 to 4000 bp. The ends of deletion fragments were blunted by S1, ligated and transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$ . Plasmid DNA isolated from transformants was screened by digestion with EcoRI and SalI restriction enzymes. Selected deletion mutants were sequenced.

Southern blot hybridization was performed with the DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) following the instructions of the manufacturer.

## Construction of pAZILSJ vector

The vector pAZILSJ, a LAB *E. coli* shuttle-cloning vector, is a derivative of the pAZIL vector [21]. The vector pAZILSJ was constructed to enable molecular analysis of cloned fragments in lactobacilli. The 1480-bp BclI fragment, carrying the origin of replication and *repB1* gene from the lactobacilli plasmid pSJ2-8 [30], was inserted into the BclI site of the pAZIL vector and selected in *E. coli* DH5 $\alpha$  (on erythromycin 300  $\mu$ g/ml). The presence of *ori* and *repB1* in the construct was confirmed by PCR amplification with BclIF and BclIR primers (S1 Table) and sequencing. The ability of pAZILSJ to replicate in different lactobacilli strains was tested.

## Construction of BGNJ1-64 and BGSJ2-8 plasmid libraries

To enable the expression of the *Lactobacillus agg* gene(s) in different *Lactococcus* and *Lactobacillus* strains, an improved derivative of the pAZIL vector was constructed. The pAZILSJ was obtained after insertion of the 1.4 kb BclI fragment from the pSJ2-8 plasmid into pAZIL BclI fragment carrying the origin of replication and the *repB1* gene. For preparation of plasmid libraries, plasmid DNA from BGNJ1-64 and BGSJ2-8 was purified by CsCl gradient centrifugation and digested with different restriction enzymes (EcoRI, PstI, SacI, BamHI and SalI). Obtained DNA fragments were cloned into the pAZILSJ vector predigested with the same restriction enzymes. The plasmid libraries were first screened in *E. coli* DH5 $\alpha$  (blue-white selection on LA plates containing erythromycin and X-gal). All plasmid derivatives carrying different fragments were transferred into non-aggregating cells. Heterologous lactococcal derivative BGKP1-20 was used because the original *Lactobacillus* derivative showed an extremely low efficiency of transformation. Only the construct pALb35, carrying SacI fragment originating from the plasmid library of BGNJ1-64, restored the auto-aggregation ability of BGKP1-20.

## Sequencing and sequence analysis

Both DNA strands were sequenced by Macrogen sequencing service (Amsterdam, The Netherlands). Sequence annotation and database searches for sequence similarities were completed using BLAST (National Center for Biotechnology Information) [31]. The DNA Strider program was used for ORF prediction. Motif Scan ([http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)), DAS Transmembrane Domain [32], and Superfamily 1.75 (<http://supfam.org/>) software were used for *in silico* analysis of the AggLb protein. The DNA sequence of the SacI/SacI fragment (11377 bp) carrying the *aggLb* gene from the pNJ1 plasmid was submitted to the EMBL GenBank under accession number HG008907.2.

## Visual aggregation assay

From the 1000 *Lactobacillus* strains from laboratory collection, the strains that exhibited aggregation ability were screened by a visual assay. Aggregation was scored as positive when clearly visible sand-like particles formed by aggregated cells gravitated to the bottom of the tube, formed a precipitate and left a clear supernatant.

## Auto-aggregation and co-aggregation assays

The auto-aggregation and co-aggregation abilities of the selected lactobacillus strains were tested according to Garcia *et al.* [33] with minor modifications. Briefly, cells from overnight culture were harvested by centrifugation (5000  $\times$  g, 10 min, 4°C), washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.1 (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 3 mM KCl) and resuspended in the same buffer. The mixture was vortexed and incubated at 30°C for 5 h. Absorbance (OD<sub>600</sub>) was measured at different time points. The percentage of auto-

aggregation was determined using the equation:  $[1 - (A_t/A_0) \times 100]$ , where  $A_t$  represents the absorbance at different time points (1, 2, 3, 4 and 5 h) and  $A_0$  is absorbance at time 0. Lactobacilli strains were classified as strongly autoaggregating (% of autoaggregation after 1 h > 30), weakly autoaggregating ( $30 < \%$  of autoaggregation after 1 h > 10) or non- autoaggregating (% of autoaggregation after 1 h < 10). For the analysis of co-aggregation between the selected lactobacillus and pathogen strains, bacterial suspensions were prepared as described above and mixed in a ratio of 1:1. The degree of co-aggregation was expressed as  $[\frac{((A_{\text{path}} + A_{\text{lb}})/2 - A_{\text{mix}})}{((A_{\text{path}} + A_{\text{lb}})/2)} \times 100]$ , where  $A_{\text{path}}$  and  $A_{\text{lb}}$  represent the absorbance in control samples containing the pathogen or the lactobacilli strain and  $A_{\text{mix}}$  represents the absorbance of the mixture at different time points.

### Biofilm assay

The ability of tested lactobacillus and pathogen strains to form biofilms was assayed in microtiter plates as previously described by Peter *et al.* [34]. *P. aeruginosa* PAO1 and *E. coli* DH5 $\alpha$  were used as positive and negative control strains, respectively.

### Collagen-binding assay

The wells of Maxisorb plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with type I collagen (from rat tail, BD Bioscience, New Jersey, United States) (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 16 h at 4°C. After immobilization, wells were washed with PBS and blocked with 2% BSA in PBS. Upon removal of the BSA solution and washing the wells with PBS, the test cultures (100  $\mu\text{l}$ ,  $10^8$  CFU/ml) were added and plates were incubated on an orbital platform shaker for 2 h at 37°C. Non-adherent cells were removed by washing the wells three times with 200  $\mu\text{l}$  of PBS. The adhered cells were fixed at 60°C for 20 min and stained with crystal violet (100  $\mu\text{l}/\text{well}$ , 0.1% solution) for 45 min. Wells were subsequently washed three times with PBS to remove the excess stain. The stain bound to the cells was dissolved in 100  $\mu\text{l}$  of citrate buffer (pH 4.3). The absorbance was measured at 570 nm after 45 min using the microtiter plate reader. Results were expressed as the mean of six replicates normalized to the negative control, according to Vesterlund *et al.* [10]. Lactobacilli were classified as strongly adherent ( $A_{570} > 0.3$ ), weakly adherent ( $0.1 < A_{570} < 0.3$ ) or non-adherent ( $A_{570} < 0.1$ ). For inhibition experiments, bacterial suspensions (100  $\mu\text{l}$ ,  $10^8$  CFU/ml) of the *Lactobacillus* strains with collagen-binding ability and control strains were pre-incubated without or with an equal volume of heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa (Sigma, Germany) at a final concentration of 1 mg/ml for 1 h at 30°C. The test cultures were added to microtiter plate wells pre-coated with collagen and incubated on an orbital platform shaker for 2 h at 37°C. Collagen binding was assayed as described above and the average of six absorbance values for each strain was compared with that of the same non-treated strains. The coherence of the results was confirmed in three independent experiments (one experiment per time, in six wells per strain). Data are presented as mean values obtained from one representative experiment. The significance was determined by Student's *t*-test.

### Competitive exclusion assay

The competitive exclusion assay of selected *Lactobacillus* strains against pathogen (*S. aureus* ATCC25923 and *E. coli* O157:H7 as representatives of Gram positive and Gram negative bacteria, respectively) was performed as reported by Yadav *et al.* [5] with minor modifications. The wells of Maxisorb plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with type I collagen (from rat tail, BD Bioscience) (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and subsequently incubated overnight at 4°C. Collagen solution was removed and wells were washed with PBS. Fresh bacterial culture (100  $\mu\text{l}$ ,  $10^8$  CFU/ml) was added and plates were incubated for 3 h at 37°C. After washing and removal of

unbound bacteria, 100  $\mu$ l of *S. aureus* ATCC25923 or *E. coli* O157:H7 culture suspension ( $10^8$  CFU/ml) in PBS was added, and the plates were incubated at 37°C for an additional 3 h. *Lactobacillus* and pathogen bacteria that bound to collagen were removed by 0.1% Triton X-100 solution for 30 min and plated on appropriate agar plates. After overnight incubation, colonies were counted. The inhibition of adhesion was expressed as the difference between adhesion of pathogen in the absence and presence of tested *Lactobacillus* strains.

### Microscopic analysis

Bacterial cells were stained with DNA fluorescent dye hexidium iodide (HI; excitation/emission at 480 nm/625 nm). Bacterial cultures (2 ml;  $10^8$  CFU/ml) were harvested and washed twice with PBS. To characterize the proteinaceous nature of the factor(s) involved in aggregation, bacterial cells were resuspended in PBS containing proteinase K (1 mg/ml) (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated for 1 h at 37°C prior staining. Cells were then incubated with 0.03  $\mu$ mol HI for 15 min at room temperature under constant rotation in the dark. After washing with PBS, stained cells were added to glass bottom dishes and assayed by confocal laser scanning microscopy using a Leica SP8 system (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Images were acquired and processed with the Leica LAS AF software.

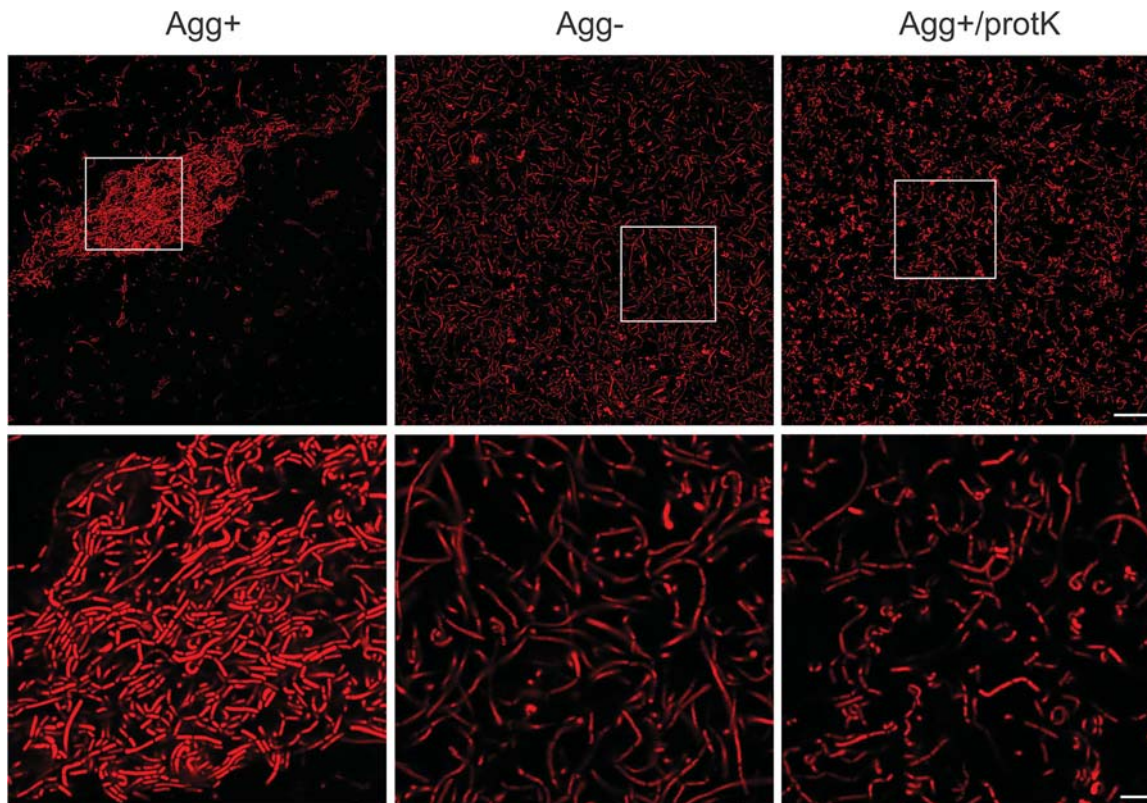
### Microbial adhesion to solvents (MATS) assay

The MATS assay was performed according to the method described previously [35]. Overnight cultures were harvested by centrifugation at  $5000 \times g$  for 10 min, washed twice with 0.1 M  $\text{KNO}_3$  (pH 6.2), and resuspended in the same buffer to an optical density of 0.4 at 400 nm ( $A_0$ ). 1.2 ml of cell suspension and 0.2 ml of solvent were pre-incubated for 10 min at room temperature. The suspension was vortexed for 1 min and the two phases were allowed to separate for 15 min. The aqueous phase was removed and optical density at 400 nm ( $A_t$ ) was measured. The bacterial affinities to different solvents were estimated as follows: % of bacterial cells adhered to solvent =  $[1 - (A_t/A_0) \times 100]$ .

## Results

### Screening of aggregation ability among natural isolates of lactobacilli

The 11 *Lactobacillus* strains showing an auto-aggregation phenotype were selected by the aggregation visual assay (Table 1). All selected strains formed snowflake-like aggregates that became visible after a few seconds of culture vortexing; within one minute, more than 80% of cells precipitated to the bottom of the tube (S1 Fig), giving a completely transparent supernatant. Among them, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 was chosen for confocal microscopic observation of multicellular aggregates because it exhibited the strongest auto-aggregation phenotype. As shown in Fig 1, (Agg<sup>+</sup>) fluorescently stained cells were able to form multicellular clumps. As expected, multicellular structures were not observed for aggregation-deficient variants (Fig 1, Agg<sup>-</sup>). Because exhibition of the auto-aggregation phenotype should be related to the surface proteins, the susceptibility of the aggregation determinants to protease inactivation was tested by incubation of bacterial cells with proteinase K. This treatment prevented formation of aggregates (Fig 1, Agg<sup>+</sup>/protK), confirming the proteinaceous nature of aggregation factor.



**Fig 1. Images of *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 obtained by confocal microscopy.** Agg<sup>+</sup>—microscopic analysis of cells of auto-aggregation positive strain *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64; Agg<sup>-</sup>—cells of the aggregation-deficient variant of this strain, not able to form multicellular structures; Agg<sup>+</sup>/protK—cells of strain BGNJ1-64 treated with proteinase K with loss of ability to form multicellular structures. Higher magnification images are presented on lower panel. Bacteria were stained with hexidium iodide fluorescent dye (excitation maximum of 480 nm and emission maximum of 625 nm). Scale bars are 25  $\mu$ m for the upper and 5  $\mu$ m for the lower panel.

doi:10.1371/journal.pone.0126387.g001

### Auto-aggregation, co-aggregation and biofilm formation of selected lactobacilli

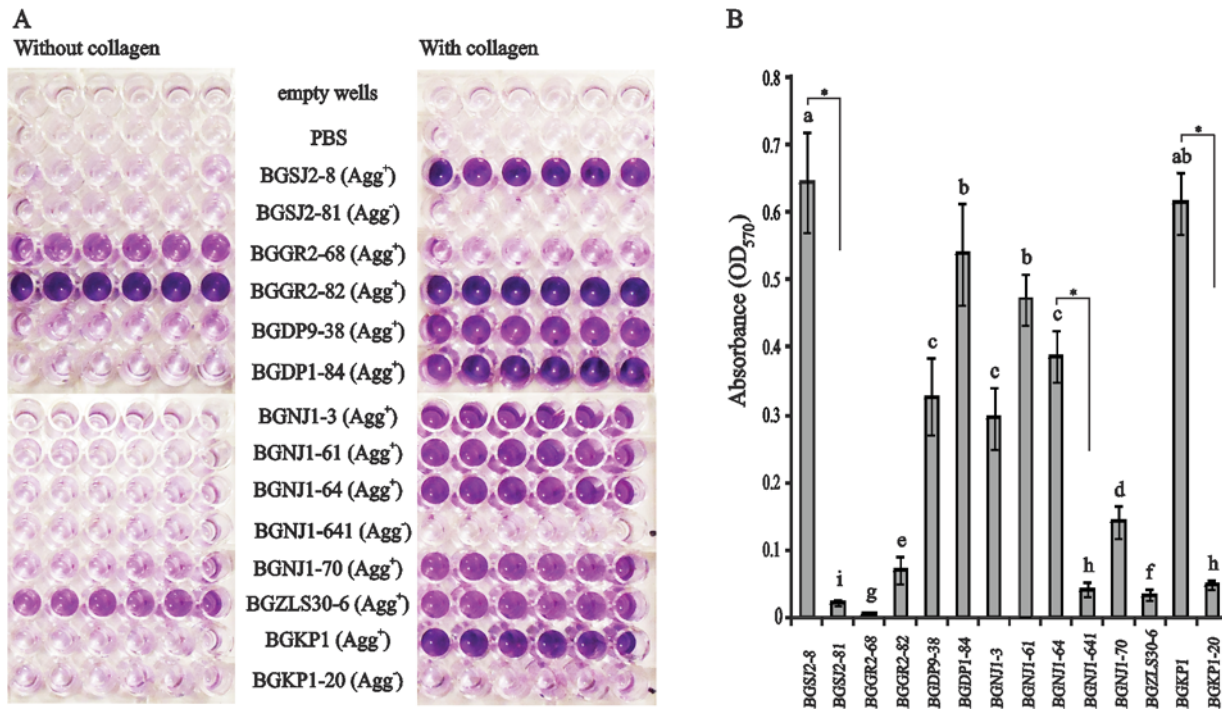
The visually observed auto-aggregation ability was further confirmed by absorbance (OD<sub>600</sub>) measurement of cultures during 5 h of sedimentation by gravity at 30°C. Tested lactobacilli showed a wide range (38.26–81.34%) of auto-aggregation degrees (S2 Table).

The co-aggregation ability was tested using BGNJ1-64 and *S. aureus* ATCC25923. Visible co-aggregates were not detected either by spectrophotometric assay or by confocal microscopy. The lack of aggregates could be attributed to the competition between auto- and co-aggregation processes or insufficient time allowed for interaction between the cells of the *Lactobacillus* and pathogen strains.

Among tested lactobacilli, only BGGR2-82 demonstrated a weak ability to form biofilms on the plastic surface of tissue-culture plates. This result clearly indicates that the aggregation phenomenon present in lactobacilli is most likely not linked to biofilm formation. Moreover, pathogenic *S. aureus* ATCC25923 and *E. coli* 0157:H7 did not show ability to form biofilms.

### Localization of genes correlated with auto-aggregation ability

Because selected Agg<sup>+</sup> strains harbor autochthonous plasmids (S2 Fig), the plasmid location of genes responsible for aggregation was determined. To substantiate the relationship between the



**Fig 2. Collagen-binding assay.** Binding of different *Lactobacillus* strains (including control strains) to immobilized collagen (A) and graphical presentation of results (B) expressed as normalized A<sub>570</sub> values. Error bars show standard deviations. Asterisk indicates a significant difference between aggregating strains and their non-aggregating derivatives (p<0.001). Within columns, values with different superior letters differ significantly (P<0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0126387.g002

presence of plasmids in cells and the auto-aggregation phenotype, a plasmid curing experiment was performed with all selected lactobacilli. Agg<sup>-</sup> derivatives were obtained for BGNJ1-64 and BGSJ2-8, which had different plasmid profiles compared to the parental strains. Obtained results strongly indicate that the gene(s) determining the presence of auto-aggregation in these two strains are located on the plasmid.

### Collagen-binding properties of selected lactobacilli

Based on the knowledge that the aggregation factor from lactococci (AggL) contains a repeat region known to mediate collagen binding, we tested the binding abilities of the selected lactobacilli (Fig 2). Cells of tested *Lactobacillus* strains adhered to immobilized collagen to different extents (Fig 2A). The most adhesive strain was BGSJ2-8 (adhesion value 0.64), while the least adhesive strain was BGNJ1-70 (adhesion value 0.14) (Fig 2B). The strains BGGR2-68, BGGR2-82, and BGZLS30-6 showed no ability to bind collagen, but these strains were able to adhere to the plastic surface of multiwell plates. Adhesion values for non-aggregating strains ranged from 0.02 to 0.05. Significant differences in adherence were obtained for aggregating strains and their non-aggregating derivatives, indicating a role of aggregation factor(s) in the specific interaction with collagen.

### Sequencing and sequence analysis of the pALb35 construct

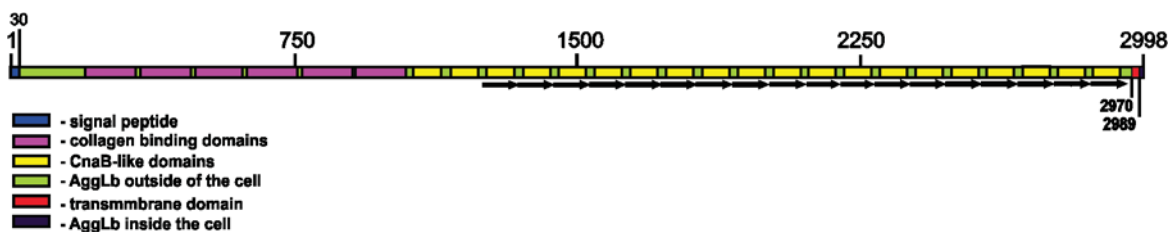
Upon the confirmation of the auto-aggregation capacity of the strain carrying construct pALb35, the complete SacI fragment was subjected to sequencing but numerous repetitive sequences at the 3'-terminal part of the cloned DNA interfered. To ensure correct sequence determination, a combination of primer walking, subcloning and nested deletion analysis using



the ExoIII/S1 treatment was applied. The 11377-bp fragment contained four ORFs (three transposase genes and one novel gene named *aggLb*) and had 42.28% G+C content. The transposase genes (two of them located upstream and one downstream of the *aggLb* gene) have already been found in other *Lactobacillus* strains sharing almost 100% identity. The novel *aggLb* gene, responsible for expression of auto-aggregation phenotype of BGNJ1-64, consists of 8994 bp. The first 4523-bp portion of *aggLb* gene shares 99% identity with genes coding for hypothetical proteins from *Lactobacillus casei* W56 (GenBank Accession No. HE970765), LC2W (GenBank Accession No. CP002617) and BDII (GenBank Accession No. CP002619). The rest of the gene, containing numerous repeats, does not show significant identity with any known gene. We identified two large direct repeats of 1196 bp inside of the gene (the first corresponding to nucleotides 3883–5078 and the second corresponding to nucleotides 5293–6488) with 100% identity. This region could be otherwise segmented in 18 repeats with almost 100% identity on nucleotide level. To confirm that the repeated sequences in the *aggLb* gene are not a result of duplications that occurred in *E. coli* during cloning and propagation, a hybridization experiment was performed. Plasmids from the BGNJ1-64 strain and clone pALb35 were digested with different restriction enzymes and probed with pALb35 (S3 Fig). The same fragments sizes were detected carrying the *aggLb* gene in both the natural plasmid and the clone, confirming that the 11377-bp clone matches the gene of the original strain.

### In silico analysis of the AggLb protein

A schematic representation of AggLb is shown in Fig 3. Protein sequence analysis revealed that the N-terminal half of AggLb shares 98% identity with hypothetical proteins in *Lb. casei* W56 (YP\_007327693.1), BD-II (YP\_005861272.1), and LC2W (YP\_005861220.1). The C-terminal half of AggLb did not show continuous identity with any known protein. AggLb appears to be the largest cell wall-anchored protein in *Lactobacillus* (318.6 kDa) and is rich in threonine (12.5%) and lysine (10.2%). The protein contains two motifs important for cell adhesion, namely collagen-binding domains in the N-terminal portion (6 times repeated at aa locations 209–340, 361–496, 507–625, 635–757, 772–904 and 906–1047) and collagen-binding protein B (CnaB)-like domains (K[ILV]ASGLT TDAKGQI[QK]VNDLKP[GS]DY YFVETAAPAGYELNDSKLNFTVELQT) in the C-terminal region (20 times repeated at aa positions 1078–1144, 1178–1247, 1270–1340, 1364–1435, 1458–1529, 1552–1623, 1646–1717, 1740–1810, 1834–1905, 1928–1999, 2022–2093, 2116–2186, 2210–2280, 2304–2374, 2398–2468, 2492–2562, 2586–2656, 2680–2750, 2774–2844 and 2868–2932). The N-terminal cleavage site of the signal peptide is predicted to be between aa-positions 30 and 31 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) [36]. AggLb is predicted to possess a cell-wall anchoring motif (LPXTG) and one transmembrane domain at position 2970–2989 (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/CW-PRED/>) [37]. In addition, AggLb has 18 almost identical consecutive repeats in the C-terminal region, each composed of 94 aa (GSVVLNKTDSDTGKALSGAVFDLYKKDGTKIASGLMTDAKGQIKVNDLKP GDY YFVETAAPAGYELNDSKLNFTVELQTTAKVATVSATNAEKT) starting



**Fig 3. Schematic representation of AggLb protein.** Boxes indicate domains of protein. Arrows indicate repeats.

doi:10.1371/journal.pone.0126387.g003

at position 1255 and ending at position 2946 aa without spaces between repeats. The first and last repeats show the highest difference in aa composition.

### Heterologous expression of the *aggLb* gene

The construct pALb35 successfully restored the aggregation phenotype in heterologous hosts *L. lactis* BGKP1-20 and *E. faecalis* BGZLS10-27 after transformation. This result supports the conclusion that *aggLb* gene is sufficient for the expression of the aggregation phenotype in closely related species. It should be noted that the aggregation ability of enterococcal cells carrying the *aggLb* gene differed from the levels obtained in *Lactococcus* and *Lactobacillus* in the type and size of cell aggregates.

### The role of *aggLb* in collagen binding

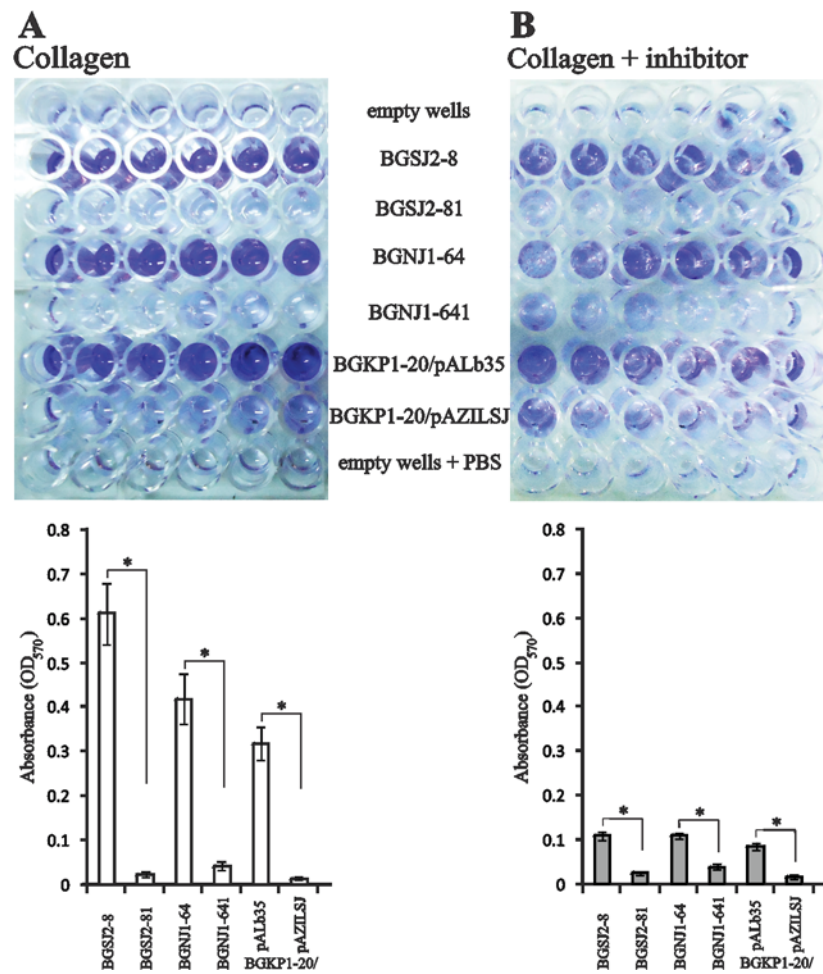
The results obtained for Agg<sup>+</sup> strains and their non-aggregating, plasmid cured derivatives, indicate a strong correlation between aggregation ability and collagen binding. To prove and eventually quantify the contribution of the *aggLb* gene (responsible for auto-aggregation) to collagen binding, selected *Lactobacillus* strains (BGSJ2-8 and BGNJ1-64), their non-aggregating derivatives (BGSJ2-81 and BGNJ1-641), and heterologous hosts (BGKP1-20/pALb35, expressing *aggLb*, and BGKP1-20/pAZILSJ, the corresponding non-aggregating control) were tested. Strains BGSJ2-8, BGNJ1-64, and BGKP1-20/pALb35 showed significantly higher degrees of adhesion (> 0.3) to immobilized collagen compared to corresponding non-aggregating derivatives (Fig 4A). Because the contribution of heterologously expressed *aggLb* to collagen binding was even higher than differences between WT strains and their plasmid cured derivatives, overall binding of bacterial cells is possibly dose-dependent on AggLb.

Heparin sodium salt and other sulphated glycosaminoglycans strongly inhibit binding of bacterial cells to ECM proteins. To measure the specificity of bacterial collagen binding, the strains listed above were subjected to the collagen-binding assay in the presence of heparin sodium salt (Fig 4B). It was found that heparin sodium salt significantly reduced collagen binding, confirming that the specific interaction of tested bacteria with collagen is mediated by the large cell-surface protein AggLb.

### Hydrophobicity of selected Agg<sup>+</sup> strains and their derivatives

To analyze whether cell-surface characteristics are dependent on aggregation factors, the hydrophobicity MATS assay was performed with BGNJ1-64 and BGKP1-20/pALb35. The BGNJ1-641 and BGKP1-20/pAZILSJ derivatives were used as controls. The three solvents used in this study were hexadecane, an apolar solvent, chloroform, a monopolar and acidic solvent and ethyl acetate, a monopolar and basic solvent (Fig 5). Only microbial adhesion to hexadecane reflects cell-surface hydrophobicity or hydrophilicity because electrostatic interactions are absent. The values of MATS obtained with chloroform and ethyl acetate were regarded as a measure of electron-donor/basic and electron-acceptor/acidic characteristics, respectively, of the bacteria. All three solvents have similar van der Waals properties.

Analyzed aggregation-positive strains exhibited very high percentages of adhesion to hexadecane. The difference in hydrophobicity between BGNJ1-64 and its non-aggregating derivative BGNJ1-641 (78.73%) was significant and remarkable, along with the difference between BGKP1-20/pALb35 and its non-aggregating derivative BGKP1-20/pAZILSJ (78.59%). Surface characteristics of the natural isolate BGNJ1-64 and the derivative with expressed AggLb (BGKP1-20/pALb35) were very similar, strongly indicating that the contribution of AggLb to the hydrophobicity of the carrier strains is almost 100%. Additionally, both strains with aggregation ability demonstrated higher affinities for chloroform (an acidic solvent) and a lower



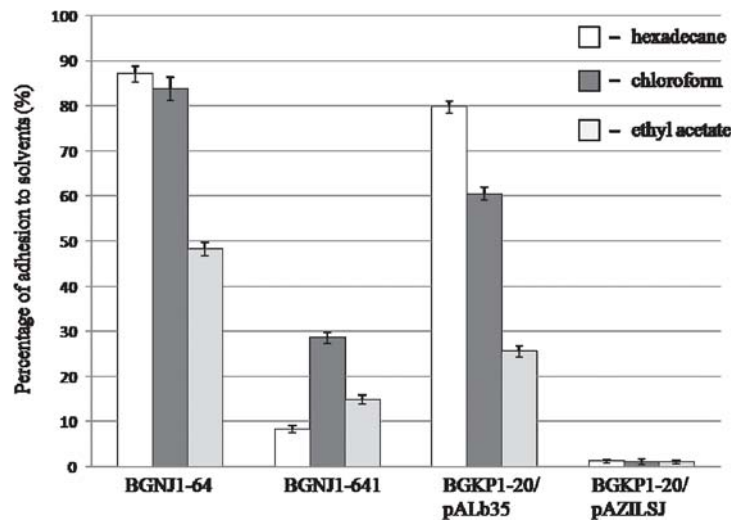
**Fig 4. Collagen-binding and inhibition assays.** Binding (A) and inhibition of binding by heparin sodium salt (B) to immobilized collagen of selected natural Agg<sup>+</sup> isolates and strains with heterologously expressed AggLb (including control strains). Lower panels show graphical presentation of results expressed as normalized A<sub>570</sub> values. Error bars show standard deviations. Asterisk indicates a significant difference (p < 0.001) between aggregating strains and their non-aggregating derivatives, as well as for aggregating strains untreated and treated with the inhibitor.

doi:10.1371/journal.pone.0126387.g004

percentage of adhesion to ethyl acetate (a basic solvent). These results indicate that AggLb is able to provide strong electron-donor and weaker electron-acceptor features to the bacteria, confirmed by their hydrophilic cell-surface properties. Moreover, results of the MATS test showed no significant difference between the BGNJ1-64 and KP1-20/pALb35 strains regarding adhesion to the same solvent, thus confirming crucial role of AggLb in the determination of cell-surface properties.

### Exclusion of *S. aureus* ATCC25923 and *E. coli* O157:H7 by selected Agg<sup>+</sup> strains and their derivatives

Because aggregation-positive strains, which carry the *aggLb* gene, demonstrated strong collagen binding affinity, the ability of AggLb to decrease pathogen adhesion to collagen was tested. Results obtained for pathogen exclusion by lactobacilli are shown in Table 2. The pathogenic strains *S. aureus* ATCC25923 and *E. coli* O157:H7 showed strong binding to immobilized



**Fig 5. Microbial adhesion to solvents.** The percent adhesion of selected strains to different solvents was determined by the MATS assay. The values are the mean of three independent experiments and error bars represent standard deviations.

doi:10.1371/journal.pone.0126387.g005

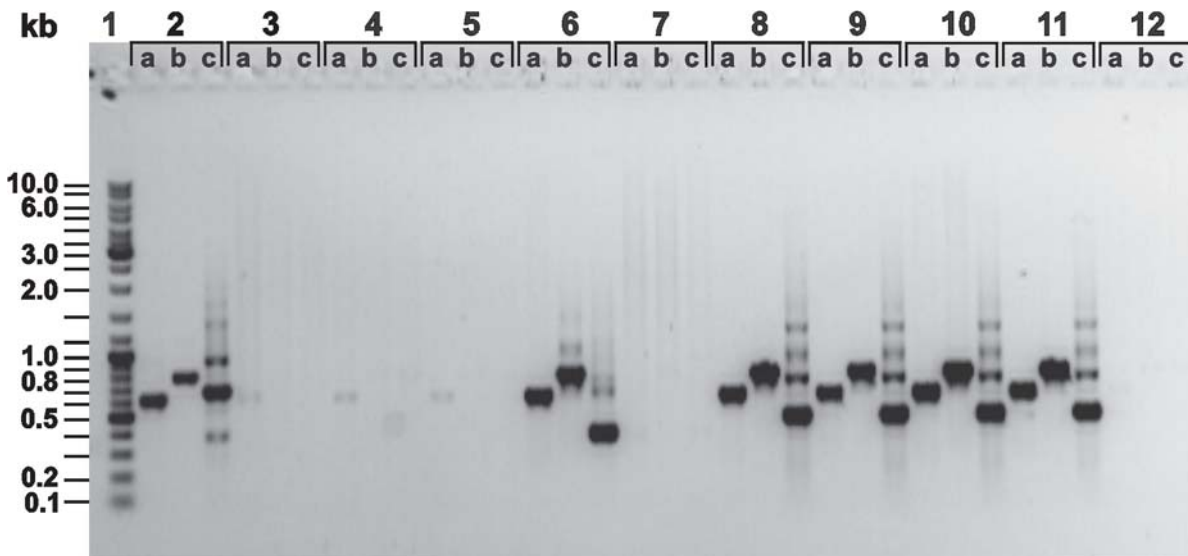
collagen ( $466 \pm 23.43$ ;  $420.6 \pm 19.36$  CFU/well, respectively). When immobilized collagen was first incubated with *Lactobacillus* strains, adhesion of the pathogens to collagen was significantly inhibited. Remarkable differences in the inhibition of the adhesion ability of *S. aureus* ATCC25923 (80.83%) and *E. coli* O157:H7 (55.39%) were observed between BGNJ1-64 and its non-aggregating derivative BGNJ1-641. The differences between BGSJ2-8 and its non-aggregation derivative BGSJ2-81 were 57.22% (for *S. aureus* ATCC25923) and 69.75% (for *E. coli* O157:H7). Additionally, to determine contribution of *aggLb* to the inhibition of *S. aureus* ATCC25923 and *E. coli* O157:H7 adhesion to collagen, the differences in inhibition of adhesion ability between aggregating strains BGKP1 and BGKP1-20/pALb35 compared to non-aggregating derivative BGKP1-20/pAZILSJ were analyzed. The quantitative binding of *S. aureus* ATCC25923 decreased from  $337.33 \pm 17.0$  CFU/well (coated with BGKP1-20/pAZILSJ) to

**Table 2. Exclusion of *S. aureus* ATCC25923 and *E. coli* O157:H7 by selected *Lactobacillus* strains.**

Experimental setting	Adhered cells of <i>S. aureus</i> (CFU/well)	Adhered cells of <i>E. coli</i> O157:H7 (CFU/well)
Immobilized collagen (control)	466 ± 23.43	420.6 ± 19.36
Immobilized collagen coated with:		
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>		
BGSJ2-8 <sup>+</sup>	47.33 ± 5.51	68.4 ± 6.69
BGSJ2-81 <sup>-</sup>	314.0 ± 15.10	361.8 ± 16.79
BGNJ1-64 <sup>+</sup>	41.0 ± 4.58	34.4 ± 5.03
BGNJ1-641 <sup>-</sup>	417.66 ± 25.38	267.4 ± 18.51
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		
BGKP1 <sup>+</sup>	68.0 ± 6.24	38.0 ± 7.31
BGKP1-20/pAZILSJ <sup>-</sup>	337.33 ± 17.0	275.0 ± 20.31
BGKP1-20/pALb35 <sup>+</sup>	44.33 ± 7.23	35.2 ± 4.15

<sup>+</sup>- aggregation-positive phenotype;  
<sup>-</sup>- aggregation-negative phenotype

doi:10.1371/journal.pone.0126387.t002



**Fig 6. Screening of selected Agg<sup>+</sup> strains for presence of *aggLb* gene by PCR.** Agarose gel electrophoresis of *aggLb* gene fragments obtained by PCR amplification with different primers (Agg1 Fw—Agg1 Rev; lanes a), (Agg2 Fw—Agg2 Rev; lanes b), (Agg3 Fw—Agg3 Rev; lanes c). Lanes: 1- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 2- BGSJ2-8; 3- BGAR75; 4- BGGR2-68; 5- BGGR2-82; 6- BGDP1-84; 7- BGDP9-38; 8- BGNJ1-3; 9- BGNJ1-61; 10- BGNJ1-64; 11- BGNJ1-70; 12- BGZLS30-6.

doi:10.1371/journal.pone.0126387.g006

68.0 ± 6.24 and 44.33 ± 7.23 CFU/well (coated with BGKP1 and BGKP1-20/pALb35, respectively). Similarly, the binding of *E. coli* O157:H7 to collagen decreased from 275.0 ± 20.31 CFU/well (coated with BGKP1-20/pAZILS) to 38.0 ± 7.31 and 35.2 ± 4.15 CFU/well (coated with BGKP1 and BGKP1-20/pALb35, respectively). These comparative assessments demonstrate that BGKP1 (carrier of *aggL* gene) inhibits adhesion of *S. aureus* ATCC25923 for 57.79% and *E. coli* O157:H7 for 56.35% on immobilized collagen, while BGKP1-20/pALb35 strain (carrier of *aggLb* gene) inhibits adhesion of *S. aureus* ATCC25923 for 62.87% and *E. coli* O157:H7 for 57.01% on the same matrix. Our results highlight the role of AggLb in the inhibition of pathogens adhesion in addition to the specific binding to collagen.

### Screening selected Agg<sup>+</sup> strains for the presence of *aggLb*

Because we were able to detect *Lactobacillus* strains with different aggregation characteristics, detection of other genes responsible for aggregation in the selected lactobacilli was performed by PCR and Southern blot.

Specific sets of primers (Agg1Fw—Agg1Rev, Agg2Fw—Agg2Rev, Agg3Fw—Agg3Rev, [S1 Table](#)) were designed for amplification of *aggLb* from the total and plasmid DNA isolated from selected lactobacilli strains. PCR fragments obtained from five (BGSJ2-8, BGDP1-84, BGNJ1-3, BGNJ1-61, BGNJ1-70) of 10 strains ([Fig 6](#)) were sequenced. The *aggLb* genes of these five aggregating lactobacilli strains were highly similar (99% identity on the nucleotide level) to that of BGNJ1-64, although the numbers of repeats were not determined.

In addition, a hybridization experiment with *aggLb* as a probe was performed with digested total and plasmid DNA of all selected lactobacilli strains. The results of hybridization fully support those obtained by PCR. The five strains in which *aggLb* was amplified by PCR showed similar restriction enzyme profiles, while the other five strains did not give any hybridization signal.

## Discussion

The main goal of this study was to investigate possible role of *Lactobacillus* aggregation factors in determination of features favored in probiotics, such as collagen binding and protection from adhesion of pathogenic bacteria. The ability of pathogenic bacteria to adhere to distinct components of the ECM, such as collagen and fibronectin, is enabled by the expression of ECM-binding proteins, termed adhesins. Adhesins are important virulence factors of pathogens, as they are involved in the initiation of infection [38]. Some lactobacilli represent beneficial microflora (probiotics) inhabiting the GI and UG tracts of humans and animals. The ability of probiotic lactobacilli to form cellular aggregates is considered desirable because this feature potentially inhibits adherence of pathogenic bacteria to intestinal mucosa. This inhibition may be accomplished by formation of a barrier via auto-aggregation on the intestinal mucosa and preventing colonization of pathogens through competition for the same targets or, alternatively, probiotics may directly co-aggregate with pathogenic bacteria and facilitate their clearance [11, 39, 40]. Considering the importance of aggregation phenomena for human health, the laboratory collection was screened for *Lactobacillus* strains exhibiting aggregation ability for further investigation. It was found that aggregation ability is a rare phenotype among lactobacilli (1–2%). Bearing in mind the complexity of the mechanisms and components involved in cell aggregation and adherence, the species specificity, environmental dependence, and contribution to multiple probiotic functional roles [11, 15, 16, 17, 21, 41], we decided to analyze the aggregation-promoting factor specific for *Lb. paracasei* and its role in collagen binding and pathogen exclusion. We attempted to determine whether the presence and expression of the aggregation-promoting factor is correlated with collagen binding by *Lactobacillus* strains.

It is interesting that we were able to localize genes for aggregation on large plasmids in only two of the selected strains. A novel shuttle cloning vector pAZILSJ was constructed to clone the *aggLb* gene of *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 and study its expression in heterologous *Lactococcus* and *Enterococcus* strains. AggLb belongs to a group of collagen-binding proteins, similar to an aggregation-promoting factor recently discovered in lactococci [21] and biosurfactants produced by several *Lactobacillus* species [42]. To our knowledge, the 318.6-kDa AggLb is the largest aggregation-promoting protein discovered so far in LAB. It has a significantly higher molecular weight than lactococci AggL (193.4 kDa). Both proteins have similar architecture, although they have no similarity at the aa level. AggLb is much longer due to the presence of 20 CnaB-like domains, in contrast to the lactococcal protein, which bears only 7 CnaB-like domains. *In silico* domain prediction by MEME (<http://meme.nbcr.net>) [43] suggests the involvement of CnaB-like domains in cell aggregation. Similar to AggLb, which has 18 repeats of 94 aa, biofilm-associated proteins have 13 identical 258-nucleotide tandem repeats encoding reiterations of an 86-aa sequence in the C-terminal region [44]. Both genes (*aggLb* and *aggL*) are located on the plasmids, which enable the potential transfer of these factors among the microbial population. Additionally, the fact that bacteria maintain and procure genes coding for aggregation factors without direct selection, despite the energy cost of plasmid replication and gene expression, suggests that this feature provides a benefit for the cell.

Analysis of the primary structure of AggLb revealed a domain organization similar to the LPXTG-type of proteins present in Gram-positive bacteria. The LPXTG motif, a highly conserved region of the C-terminal sorting signal, plays a crucial role in covalent linkage of many cell-wall-associated surface proteins to the nascent pentaglycine cross-bridge of peptidoglycan [45]. The CnaB-like domain is the most abundant domain of AggLb and is likely involved in mediation of bacterial adherence to collagen. In addition, repeated units have been suggested to serve as a 'stalk' that exposes the region crucial for adherence to the bacterial surface, thus

facilitating bacterial adherence to collagen [46]. Finally, heterologous expression of *aggLb* revealed the indispensable role of AggLb in aggregation phenomena and in the strong and specific binding to collagen. The collagen-binding ability of aggregation-positive strains expressing AggLb may be beneficial characteristic for probiotic strains because it could provide protection of the EMC from adhesion of pathogens, most likely by competition for the same attachment sites. Similar results were obtained by other authors for different surface proteins. Removal of the S-layer proteins from *Lb. crispatus* ZJ001 reduced auto-aggregation and adhesion of *Salmonella typhimurium* and *E. coli* O157:H7 to HeLa cells via competitive exclusion [47]. The protective effect of *Lb. reuteri* on inhibition of adherence of *S. aureus* to keratinocytes was mediated by competitive exclusion. Keratinocyte survival was significantly higher when the probiotic was applied prior to or simultaneously with *S. aureus* infection, but not when it was added after infection had commenced [48]. The number of adhering *S. aureus* and *S. epidermidis* cells after co-incubation with biosurfactants from *Lb. acidophilus* was reduced by 5–56% in a strain- and dose-dependent manner [49]. Zarate *et al.* demonstrated the ability of *Lb. paracasei* CRL1289, a human vaginal strain with probiotic properties, to prevent the vaginal colonization by an uropathogenic strain of *S. aureus* [50].

Based on the presented results we conclude that AggLb is a novel aggregation-promoting factor from *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 that contributes to the diverse functions and behavior of the carriers, including strong aggregation ability, strong and specific interaction with collagen through changes to cell-surface properties. AggLb is most likely involved in protection of the host ECM from pathogen infection by a mechanism of competitive exclusion. Based on the morphological characteristics and the degree of aggregation in heterologous strains used in this study, it can be speculated that even though AggLb is crucial for aggregation, some additional host factors may have a modulatory effect on the aggregation phenotype.

We found at least two types of aggregation-promoting factors in *Lb. paracasei*. We cloned and characterized one of these factors, AggLb, which was present in more than 50% of the analyzed strains. The other(s) remains uncharacterized and will be addressed in future work. Our results, together with other published data, indicate the presence of diverse aggregation factors in lactobacilli, even within the same species. Because the interest in the aggregation of lactobacilli is related to their probiotic function [33], further experiments will be primarily focused on the interaction of AggLb with human epithelial cells and the role of the interaction in the adhesion and possible adjustment of the immune response. Moreover, it will be interesting to study contribution of the different domains and repeats of AggLb to the modulation of the aggregation phenotype.

## Supporting Information

**S1 Fig. Visual aggregation assay.** Aggregation ability of *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* strains in liquid growth medium after overnight cultivation (A) and vigorous mixing (B). Lanes: 1- growth medium; 2- BGSJ2-8; 3- BGGR2-68; 4- BGGR2-82; 5- BGDP1-84; 6- BGDP9-38; 7- BGNJ1-3; 8- BGNJ1-61; 9- BGNJ1-64; 10- BGNJ1-70; 11- BGZLS30-6; 12- BGAR75. (TIF)

**S2 Fig. Plasmid profiles of selected *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* strains expressing aggregation ability.** Lanes: 1- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 2- BGSJ2-8; 3- BGGR2-68; 4- BGGR2-82; 5- BGDP1-84; 6- BGDP9-38; 7- BGNJ1-3; 8- BGNJ1-61; 9- BGNJ1-64; 10- BGNJ1-70; 11- BGZLS30-6; 12- BGAR75. (TIF)

**S3 Fig. Southern blot hybridization experiment with clone pALb35 as a probe.** (A) Agarose gel with total plasmid DNA isolated from *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 (lanes 2, 4, 6, 8, 10 and 12) and clone pALb35 (lanes 3, 5, 7, 9, 11 and 13), digested with SacI (lanes 2 and 3), XbaI (lanes 4 and 5), EcoRV (lanes 6 and 7), EcoRI (lanes 8 and 9), PstI (lanes 10 and 11), and SphI (lanes 12 and 13), (B) Membrane after hybridization of the digested DNA with the probe (lane 14, probe as positive control). Lanes 1 and 15, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. (TIF)

**S1 Table. Primers used in the study.**

(DOCX)

**S2 Table. Auto-aggregation abilities of selected lactobacilli determined by spectrophotometry measurements (OD 600) within 5h.**

(DOCX)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MM MK. Performed the experiments: MM MT MZ SK MK. Analyzed the data: MM IS MK. Contributed reagents/materials/analysis tools: MM. Wrote the paper: MM IS SK NG MK.

## References

1. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected micro-organisms referred to EFSA (2007) The EFSA Journal 587: 1–16.
2. FAO-WHO (2006) Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutritional paper No. 85 (ISBN 92-5-105513-0).
3. Turpin W, Humblot C, Noordine ML, Thomas M, Guyot JP (2012) Lactobacillaceae and cell adhesion: genomic and functional screening. PLoS One 7: e38034. doi: [10.1371/journal.pone.0038034](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038034) PMID: [22675431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22675431/)
4. Wa ko A, Polak-Berecka M, Paduch R, Jó wiak K (2014) The effect of moonlighting proteins on the adhesion and aggregation ability of *Lactobacillus helveticus*. Anaerobe 30: 161–168.
5. Yadava AK, Tyagia A, Kaushika JK, Saklanib AC, Grovera S, Batish VK (2013) Role of surface layer collagen binding protein from indigenous *Lactobacillus plantarum* 91 in adhesion and its anti-adhesion potential against gut pathogen. Microbiol Res 168: 639–645. doi: [10.1016/j.micres.2013.05.003](https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.05.003) PMID: [23890721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23890721/)
6. Sillanpää J, Martínez B, Antikainen J, Toba T, Kalkinen N, Tankka S, et al. (2000) Characterization of the collagen-binding S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. J Bacteriol 182: 6440–6450. PMID: [11053389](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11053389/)
7. Lorca G, Torino MI, Font de Valdez G, Ljungh AA (2002) Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. FEMS Microbiol Lett 206: 31–37. PMID: [11786253](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11786253/)
8. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M (1994) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissue. Annu Rev Microbiol 48: 585–617. PMID: [7826020](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7826020/)
9. Dubreuil JD, Giudice GD, Rappuoli R (2002) *Helicobacter pylori* interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process. Microbiol Mol Biol Rev 66: 617–629. PMID: [12456785](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12456785/)
10. Switalski LM, Patti JM, Butcher W, Gristina AG, Speziale P, Höök M (1993) A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. Mol Microbiol 7: 99–107. PMID: [8382334](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8382334/)
11. Schachtsiek M, Hammes WP, Hertel C (2004) Characterization of *Lactobacillus cornyformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. Appl Environ Microbiol 70: 7078–7085. PMID: [15574903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15574903/)
12. Reniero R, Coconcelli P, Bottazzi V, Morelli L (1992) High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. J Gen Microbiol 138: 763–768.



13. Boris S, Suárez JE, Barbés C (1997) Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *J Appl Microbiol* 83: 413–20. PMID: [9351223](#)
14. Nikolic M, Jovcic B, Kojic M, Topisirovic L (2010) Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. *Eur Food Res Technol* 231: 925–931.
15. Goh YJ, Klaenhammer TR (2010) Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol* 76: 5005–5012. doi: [10.1128/AEM.00030-10](#) PMID: [20562289](#)
16. Jankovic I, Ventura M, Meylan V, Rouvet M, Elli M, Zink R (2003) Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2. *J Bacteriol* 185: 3288–3296. PMID: [12754226](#)
17. Kos B, Suskovic J, Vukovic S, Simpraga M, Frece J, Matosic S (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* 94: 981–987. PMID: [12752805](#)
18. Lozo J, Jovcic B, Kojic M, Dalgalarondo M, Chobert JM, Haertlé T, et al. (2007) Molecular characterization of a novel bacteriocin and an unusually large aggregation factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, a natural isolate from homemade cheese. *Curr Microbiol* 55: 266–271. PMID: [17657532](#)
19. Vitetta L, Coulson S, Linnane AW, Butt H (2013) The gastrointestinal microbiome and musculoskeletal diseases: a beneficial role for probiotics and prebiotics. *Pathogens* 2: 606–626.
20. Veljovic K, Terzic-Vidojevic A, Vukasinovic M, Strahinic I, Begovic J, Lozo J, et al. (2007) Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlata cheese. *J Appl Microbiol* 103: 2142–2152. PMID: [18045397](#)
21. Kojic M, Jovcic B, Strahinic I, Begovic J, Lozo J, Veljovic K, et al. (2011) Cloning and expression of novel lactococcal aggregation factor from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1. *BMC Microbiol* 11: 265. doi: [10.1186/1471-2180-11-265](#) PMID: [22182285](#)
22. Valenzuela AS, ben Omar N, Abriouel H, López RL, Veljovic K, Ca amero MM, et al. (2009) Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control* 20: 381–385.
23. Hanahan D (1983) Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557–580. PMID: [6345791](#)
24. Holo H, Nes IF (1995) Transformation of *Lactococcus* by electroporation. *Meth Mol Biol* 47: 195–199. PMID: [7550735](#)
25. O'Sullivan DJ, Klaenhammer TR (1993) Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* ssp. *Appl Environ Microbiol* 59: 2730–2733. PMID: [16349028](#)
26. Kojic M, Strahinic I, Fira D, Jovcic B, Topisirovic L (2006) Plasmid content and bacteriocin production by five strains of *Lactococcus lactis* isolated from semi-hard cheese. *Can J Microbiol* 52: 1110–1120. PMID: [17215903](#)
27. Anderson DG, McKay LL (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl Environ Microbiol* 46: 549–552. PMID: [6416164](#)
28. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
29. Hopwood DA, Bibb JM, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, et al. (1985) *Genetic manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual*. The John Innes Foundation, Norwich, UK.
30. Kojic M, Lozo J, Jovcic B, Strahinic I, Fira D, Topisirovic L (2010) Construction of a new shuttle vector and its use for cloning and expression of two plasmid-encoded bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8. *Int J Food Microbiol* 140: 117–124. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.010](#) PMID: [20439125](#)
31. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402. PMID: [9254694](#)
32. Cserzo M, Wallin E, Simon I, von Heijne G, Elofsson A (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Prot Eng* 10: 673–676.
33. García-Cayuela T, Korany AM, Bustos I, Gómez de Cadiñanos LP, Requena T, Peláez C, et al. (2014) Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Res Int* 57: 44–50.
34. Peter A, Zacharia S, Mathew J (2013) Biofilm formation in enterococci from different source. *Int J Biopharm* 4: 140–144.

35. Pelletier C, Bouley C, Cayela C, Bouttier S, Bourlioux P, Bellon Fontaine MN (1997) Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl Environ Microbiol* 63:1725–1731. PMID: [9143109](#)
36. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8: 785–786. doi: [10.1038/nmeth.1701](#) PMID: [21959131](#)
37. Fimereli DK, Tsigros KD, Litou ZI, Liakopoulos TD, Bagos PG, Hamodrakes SJ (2012) CW-PRED: a HMM-based method for the classification of cell wall-anchored proteins of Gram-positive bacteria. *Lect Not Comp Sci* 7297: 285–290.
38. Flock JI (1999) Extracellular-matrix-binding proteins as targets for the prevention of *Staphylococcus aureus* infections. *Mol Med Today* 5: 532–537. PMID: [10562719](#)
39. Younes JA, van der Mei HC, van den Heuvel E, Busscher HJ, Reid G (2012) Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli. *PLoS One* 7: e36917. doi: [10.1371/journal.pone.0036917](#) PMID: [22629342](#)
40. Reid G, Mc Groarty JA, Domingue PAG, Chow AW, Bruce AW, Eisen A, et al. (1990) Coaggregation of urogenital bacteria *in vitro* and *in vivo*. *Curr Microbiol* 20: 47–52.
41. Turpin W, Humblot C, Noordine ML, Wrzosek L, Tomas J, Mayeur C, et al. (2013) Behavior of lactobacilli isolated from fermented slurry (ben-saalga) in gnotobiotic rats. *PLoS One* 8: e57711. doi: [10.1371/journal.pone.0057711](#) PMID: [23577056](#)
42. Howard JC, Heinemann C, Thatcher BJ, Martin B, Gan BS, Reid G (2000) Identification of collagen-binding proteins in *Lactobacillus* spp. with surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight ProteinChip technology. *Appl Environ Microbiol* 66: 4396–4400. PMID: [11010889](#)
43. Bailey TL, Elkan C (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in bio-polymers. *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. AAAI Press, Menlo Park, California. Available: <http://meme.nbcr.net>.
44. Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, et al. (2004) Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 72: 2177–2185. PMID: [15039341](#)
45. Ton-That H, Lui G, Mazmanian SK, Faul KF, Schneewind O (1999) Purification and characterization of sortase, the trans-peptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12424–12429. PMID: [10535938](#)
46. Deivanayagam CC, Rich RL, Carson M, Owens RT, Danthuluri S, Bice T, et al. (2000) Novel fold and assembly of the repetitive B region of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding surface protein. *Structure* 15:67–78.
47. Chen X, Xu J, Shuai J, Chen J, Zhang Z, Fang W (2007) The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Int J Food Microbiol* 115: 307–312. PMID: [17289201](#)
48. Prince T, McBain AJ, O'Neill CA (2012) *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *Staphylococcus aureus*—induced cell death by competitive exclusion. *Appl Environ Microbiol* 78: 5119–5126. doi: [10.1128/AEM.00595-12](#) PMID: [22582077](#)
49. Walencka E, Rózsalska S, Sadowska B, Rózsalska B (2008) The influence of *Lactobacillus acidophilus* derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol (Praha)* 53: 61–66.
50. Zárate G, Santos V, Nader-Macias ME (2007) Protective effect of vaginal *Lactobacillus paracasei* CRL 1289 against urogenital infection produced by *Staphylococcus aureus* in a mouse animal model. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2007: 48358. doi: [10.1155/2007/48358](#)



# Shortening of the *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 AggLb Protein Switches its Activity from Auto-Aggregation to Biofilm Formation

Marija Miljkovic<sup>1</sup>, Iris Bertani<sup>2</sup>, Djordje Fira<sup>1,3</sup>, Branko Jovcic<sup>1,3</sup>, Katarina Novovic<sup>1</sup>, Vittorio Venturi<sup>2</sup> and Milan Kojic<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory for Molecular Microbiology, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, <sup>2</sup> Bacteriology Group, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Area Science Park, Trieste, Italy, <sup>3</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Aldo Corsetti,  
University of Teramo, Italy

### Reviewed by:

Giuseppe Spano,  
University of Foggia, Italy  
Michael Gänzle,  
University of Alberta, Canada  
Andrea Gomez-Zavaglia,  
Center for Research  
and Development in Food  
Cryotechnology (CIDCA, CONICET),  
Argentina

### \*Correspondence:

Milan Kojic  
mkojic@imgge.bg.ac.rs

### Specialty section:

This article was submitted to  
Food Microbiology, a  
section of the journal  
Frontiers in Microbiology

Received: 29 March 2016

Accepted: 26 August 2016

Published: xx September 2016

### Citation:

Miljkovic M, Bertani I, Fira D,  
Jovcic B, Novovic K, Venturi V and  
Kojic M (2016) Shortening of the  
*Lactobacillus paracasei* subsp.  
*paracasei* BGNJ1-64 AggLb Protein  
Switches its Activity from  
Auto-Aggregation to Biofilm  
Formation. *Front. Microbiol.* 7:1422.  
doi: 10.3389/fmicb.2016.01422

AggLb is the largest (318.6 kDa) aggregation-promoting protein of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 responsible for forming large cell aggregates, which causes auto-aggregation, collagen binding and pathogen exclusion *in vitro*. It contains an N-terminus leader peptide, followed by six successive collagen binding domains, 20 successive repeats (CnaB-like domains) and an LPXTG sorting signal at the C-terminus for cell wall anchoring. Experimental information about the roles of the domains of AggLb is currently unknown. To define the domain that confers cell aggregation and the key domains for interactions of specific affinity between AggLb and components of the extracellular matrix, we constructed a series of variants of the *aggLb* gene and expressed them in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1-20 using a lactococcal promoter. All of the variants contained a leader peptide, an inter collagen binding-CnaB domain region (used to raise an anti-AggLb antibody), an anchor domain and a different number of collagen binding and CnaB-like domains. The role of the collagen binding repeats of the N-terminus in auto-aggregation and binding to collagen and fibronectin was confirmed. Deletion of the collagen binding repeats II, III, and IV resulted in a loss of the strong auto-aggregation, collagen and fibronectin binding abilities whereas the biofilm formation capability was increased. The strong auto-aggregation, collagen and fibronectin binding abilities of AggLb were negatively correlated to biofilm formation.

**Keywords:** AggLb, collagen binding domains, CnaB-like domains, auto-aggregation, biofilm formation

## INTRODUCTION

*Lactobacillus* strains could exhibit probiotic characteristics, which confer a variety of beneficial health effects on the host and they have a number of features that make it particularly suitable for dairy applications (Salminen et al., 1998; Lebeer et al., 2008; Sisto and Lavermicocca, 2012; Giraffa, 2014). *Lactobacillus* effector molecules that contribute to the health-promoting interactions with the host (intestinal) system are likely located in the bacterial cell envelope (Bron et al., 2004;

Kleerebezem et al., 2010; Hymes et al., 2016). It was found that adhesion of lactobacilli to components of the extracellular matrix (ECM) such as mucin, fibronectin, collagen, laminin, or fibrinogen may thus have a direct impact on their probiotic function, e.g., in preventing the adhesion to and the colonization of damaged intestinal tissue sites by invading pathogens (Lorca et al., 2002). It has been reported that damage of the mucosal layer of the ECM can result in its colonization by pathogens, resulting in subsequent infection (Styriak et al., 2003).

The ability of pathogenic bacteria to adhere to distinct components of the ECM, such as collagen and fibronectin, is enabled or facilitated by the expression of ECM-binding proteins, termed adhesins. Adhesins are important virulence factors of pathogens, as they are involved in the initiation of infection (Flock, 1999). Group A streptococci (GAS, *Streptococcus pyogenes*) have evolved a number of surface-bound and secreted virulence factors, of which the M proteins are probably the best characterized. Binding of GAS to epithelial cells involves an interaction between M protein and fibronectin (Oehmcke et al., 2010). Epithelial cell invasion by Group B *Streptococcus* (GBS) is associated with expression of alpha C protein (Bolduc and Madoff, 2007). Aggregation protein encoded by *asp1* gene of enterococci, characterized as a virulence factor of 142 kDa plays a crucial role in adherence to eukaryotic cells (Galli et al., 1990). In the skin abscess model, a sortase-deficient *Staphylococcus aureus* strain lacking all of its cell-wall anchored proteins was less virulent than its wild-type strain. Also, strains specifically lacking protein A, fibronectin binding proteins, clumping factor A or surface protein SasF were impaired in their virulence (Josefsson et al., 2008; Kwiecinski et al., 2014). In addition some biofilm factors related to aggregation ability, for example, Bap protein of *S. aureus* facilitates the persistence in the mammary gland by enhancing adhesion to epithelial cells and prevents cellular internalization through the binding to GP96 host receptor (Taglialegna et al., 2016).

Since systematic analysis of efficacy of probiotic therapy demonstrated that probiotic activities are strain-specific (Hungin et al., 2013; Sanders et al., 2013) the paradigm of probiotic research is rightfully shifting toward understanding the mechanistic action of each specific strain (Johnson and Klaenhammer, 2014). It has been demonstrated that the purified collagen binding protein (Cbp) from *L. plantarum* 91 possess anti-adhesion activity against the enteric pathogen *Escherichia coli* O157:H7 on immobilized collagen (Yadava et al., 2013). Surface fibronectin binding protein from *L. casei* BL23 participates in cell attachment to immobilized fibronectin (Muñoz-Provencio et al., 2010). Also, binding of immobilized collagen and fibronectin by *L. acidophilus* CRL 639 depends on cell-surface proteins (Lorca et al., 2002). The S-layer proteins of *L. crispatus* ZJ001 also inhibited the adhesion of *Salmonella typhimurium* and *E. coli* O157:H7 to HeLa cells (Chen et al., 2007). In addition, the S-layer protein associated with moonlighting proteins acted as an adherence factor, which has been evidenced by the high capability of adhesion,

auto- and co-aggregation of *L. helveticus* T159 (Waśko et al., 2014).

The ability of lactobacilli to form multicellular aggregates is an important property for colonization of the oral cavity, human gut or urogenital tract. The underlying mechanisms and the functionality of surface aggregation factors are not fully understood; on the one hand aggregation ability may not be the only components responsible for adhesion, and some of the criteria may be part of a complex mechanism that enables the microorganisms to interact with the host and to exert their beneficial effects (García-Cayuela et al., 2014). On the other hand, important mechanisms involved in this process are thought to include adherence as well as colonization of the GIT (Nazzaro et al., 2012; Skrzypczak et al., 2015). The expression of adhesins on the cell surface could induce cell aggregation visible as auto-aggregation. Aggregation promoting factors of lactobacilli differ in size, from 2 kDa in the strain *Lactobacillus gasserii* 2459–318.6 kDa in *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 (Boris et al., 1997; Miljkovic et al., 2015). Interestingly we have reported a new group of aggregation promoting factors of a high molecular mass, recently discovered in LAB (Kojic et al., 2011; Miljkovic et al., 2015). They differ in size and primary structure; however, they share similar structural organization and functions because they are composed of a large number of collagen-binding and CnaB-like domains (Miljkovic et al., 2015). Currently, no experimental evidence exists concerning the role of these domains in aggregation except for predictions that are based on a *S. aureus* collagen-binding Cna protein that mediates bacterial adherence to collagen. The major differences between the aggregation factors of the LAB and the Cna protein of *S. aureus* are that the primary structure of Cna has a non-repetitive collagen binding A region, followed by a repetitive B region (one–four 23 kDa repeating units B1–B4, depending on the strain). It has been suggested that the A region is involved in collagen binding, while the B region acts as a “stalk” that projects the A region from the bacterial surface, facilitating its adherence to collagen (Deivanayagam et al., 2000).

As mentioned above, the AggLb protein is the largest (318.6 kDa) aggregation factor of lactobacilli responsible for auto-aggregation, collagen binding and pathogen exclusion *in vitro*. AggLb consists of six diverse collagen binding domains (from 13202–15256 Da repeating units) and 20 almost identical CnaB-like domains (a 9916 Da repeating unit). The aim of this study was to investigate the roles of the different domains of the AggLb protein involved in probiotic function; this information might prove useful for its potential application. A series of variants of *aggLb* gene/protein were constructed, and their capability to induce auto-aggregation, binding to collagen and fibronectin, and biofilm formation was analyzed. It was concluded that AggLb could provide all of these functions: aggregation and binding to collagen and fibronectin as well as biofilm formation. Interestingly, strong auto-aggregation, collagen and fibronectin binding capacities of AggLb are negatively correlated with the ability of biofilm formation.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial Strains, Plasmids, and Growth Conditions

The strains, their derivatives and plasmids used in this study are listed in **Table 1**. *L. paracasei* was grown in De Man-Rogosa-Sharpe (MRS; Merck GmbH, Darmstadt, Germany) medium at 30°C. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* was grown at 30°C in M17 medium (Merck) supplemented with 0.5% glucose (GM17). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *E. coli* DH5 $\alpha$  and M15 used for cloning and propagation of constructs were routinely grown in Luria-Bertani medium (LB) at 37°C with aeration. To obtain solid medium, agar (15 g/l; Torlak, Belgrade, Serbia) was added. Erythromycin was added to a final concentration of 10  $\mu$ g/ml and 300  $\mu$ g/ml for LAB and *E. coli*, respectively. Ampicillin and kanamycin were added to a final concentration of 100  $\mu$ g/ml for *E. coli*. When necessary, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-Gal; Fermentas, Vilnius, Lithuania) was added to LB medium plates at a final concentration of 40  $\mu$ g/ml for blue/white color selection of colonies.

### DNA Manipulations

Electrocompetent *L. lactis* subsp. *lactis* BGKPI-20 cells was prepared as described by Holo and Nes (1989). Transformations were done by electroporation using an Eppendorf Electroporator (Eppendorf, Hamburg, Germany), except *E. coli* DH5 $\alpha$  and M15, which was transformed by heat shock (Hanahan, 1983). Appropriate agar plates with antibiotics were used for the selection of transformants.

Plasmid DNA from *E. coli* DH5 $\alpha$  was isolated by QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Digestion with restriction enzymes was conducted according to the supplier's instructions (Fermentas). DNA fragments were purified from agarose gels using a QIAquick Gel extraction kit as described by the manufacturer (Qiagen). DNA was ligated with T4 DNA ligase (Agilent technologies, USA) according to the manufacturer's recommendations.

Specific primers used in this study are listed in section: Construction of the *aggLb* gene variants. KapaTaq DNA polymerase (Kapa Biosystems, Inc., Boston, MA, USA) was used to amplify DNA fragments by PCR using a GeneAmp PCR system 2700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR products were purified with a QIAquick PCR purification kit (Qiagen) according to the protocol of the supplier and sequenced by the Macrogen Sequencing Service (Macrogen, Netherlands). The DNA Strider program was used for open reading frame (ORF) prediction. Commercial pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Thermo Scientific) and pCRII (Thermo Scientific) vectors were used for cloning of PCR products.

### Construction of the *aggLb* Gene Variants

From construct pAlb35 (Miljkovic et al., 2015) using *XbaI-SalI* restriction enzymes we made shorter construct pAggLbXS carrying only *aggLb* gene, in pAZIL vector (Supplementary Figure 1A). *PstI* restriction site is located in *aggLb* gene

at position to divide it into two regions: first containing leader peptide sequence and six collagen binding domains and second containing 20 CnaB-like domains and anchor domain (**Figure 1**). In order to facilitate the construction of a large number of variants, *aggLb* gene was subcloned from pAggLbXS in two parts into pBScript vector (Agilent technologies): first part as *XbaI-PstI* (construct pBS-XP) and second as *PstI-SalI* fragments (construct pBS-PS; Supplementary Figure 1A). Bioinformatic analysis showed that *HindIII* (in both fragments; Supplementary Figures 1B,D) and *SspI* (only in *XbaI-PstI* fragment; Supplementary Figure 1C) restriction enzymes dividing AggLb protein to distinct portions that contain the exact number of codons without free base except one in *XbaI-PstI* fragment, so that they can be deleted or combined because they provide in frame junction. Constructs pBS-XP [consisting of three *HindIII* fragments of 820 bp, 821 bp (this two cannot be deleted separately since deletion of each fragment changed frame and introduce frameshift mutation) and 1461 bp] and pBS-PS (consisting of four *HindIII* fragments of 846 bp, 1266 bp, and two of 1410 bp) were partially digested with *HindIII* restriction enzyme and ligated. We successfully constructed pBS-XP-1, pBS-XP-4, pBS-PS-A, pBS-PS-B, pBS-PS-C, pBS-PS-D, and pBS-PS-E (for details see **Table 1** and Supplementary Figure 1). From construct pBS-XP fragment carrying *XbaI/PstI* was recloned into pCR2.1-TOPO (since does not contain *SspI* restriction site; Thermo Scientific, Lithuania) giving construct pCR-XP, which was additionally partially digested with *SspI* restriction enzyme and ligated (constructs pCR-XP-2 and pCR-XP-3; Supplementary Figure 1). In next step, different constructs containing deletion in first part (pBS-XP-1, pBS-XP-4, pCR-XP-2, and pCR-XP-3) were combined with constructs containing deletion in second part (pBS-PS-A, pBS-PS-B, pBS-PS-C, pBS-PS-D, and pBS-PS-E) in pBScript vector (for details see **Table 1** and **Figure 1**). In order to obtain expression in lactococci, lactococcal promoter *PlsB* (Uzelac et al., 2015) was cloned into pAZIL vector together with leader sequence of *aggLb* gene as *SacI-EagI* fragment (construct pAZIL-pSE). After that different combinations of variants from pBScript vector were cloned as *EagI-SalI* fragments into pAZIL-pSE (for details see **Table 1** and **Figure 1**). *L. lactis* subsp. *lactis* BGKPI-20 was transformed with chosen constructs and expression of different AggLb variants were confirmed by Dot blot analysis using anti-AggLb antibody.

In addition, using template clone KPPvSci (Kojic et al., 2011) and specific set of primers: KPFw (5'GCAAAGCGCCATTCGCC3'), KPPstIRev (5'CGTTCCTTCTGCAGTTCCAC3'), after PCR amplification, we obtained clone pCRII-KPI. *BamHI-PstI* fragment containing first part of AggL (aggregation factor from *L. lactis* subsp. *lactis* BGKPI) was recloned from pCRII-KPI into pBS-PS, from which entire hybrid molecule as *BamHI/XhoI* was transferred to pAZIL vector (digested with *BamHI/SalI*) and finally obtained clone was named as pKP-Lb (**Table 1**).

### Auto-Aggregation Assay

The first step of screening strains was visual auto-aggregation assay. The aggregation phenotype was scored as positive when clearly visible snowflakes-like particles, formed by aggregated

**TABLE 1 | Bacterial strains and plasmids used in the study.**

General characteristics		Source or reference
<b>Strain</b>		
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>		
BGNJ1-64	Natural isolate; Agg <sup>+</sup>	Mijlkovic et al., 2015
BGNJ1-641	Derivative BGNJ1-64; Agg <sup>-</sup>	Mijlkovic et al., 2015
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>		
BGKP1	Natural isolate; Agg <sup>+</sup>	Kojic et al., 2011
BGKP1-20	Derivative BGKP1; Agg <sup>-</sup>	Kojic et al., 2011
BGKP1-20/pAZIL-pPIAggLb	Derivative BGKP1-20 carrying pPIAggLb	This study
BGKP1-20/pPI4E	Derivative BGKP1-20 carrying pPI4E	This study
BGKP1-20/pPI3C	Derivative BGKP1-20 carrying pPI3C	This study
BGKP1-20/pPI3D	Derivative BGKP1-20 carrying pPI3D	This study
BGKP1-20/pPI3E	Derivative BGKP1-20 carrying pPI3E	This study
BGKP1-20/pPI2B	Derivative BGKP1-20 carrying pPI2B	This study
BGKP1-20/pPI2D	Derivative BGKP1-20 carrying pPI2D	This study
BGKP1-20/pPI2E	Derivative BGKP1-20 carrying pPI2E	This study
BGKP1-20/pPI1A	Derivative BGKP1-20 carrying pPI1A	This study
BGKP1-20/pPI1D	Derivative BGKP1-20 carrying pPI1D	This study
BGKP1-20/pPI1E	Derivative BGKP1-20 carrying pPI1E	This study
BGKP1-20/pKP-Lb	Derivative BGKP1-20 carrying pKP-Lb	This study
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>		
MG7284	Prt <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Bac <sup>f</sup> , Fus <sup>f</sup> , Spc <sup>f</sup>	Gasson, 1983
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
M15	Nal <sup>s</sup> , Str <sup>s</sup> , Rif <sup>s</sup> , Thi <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Ara <sup>+</sup> , Gal <sup>+</sup> , Mtl <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , RecA <sup>+</sup> , Uvr <sup>+</sup> , Lon <sup>+</sup>	Qiagen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1		Laboratory collection
<b>Plasmids and constructs</b>		
pGEM-T Easy Vector	3015 bp, Amp <sup>r</sup> , bacterial, non-viral, transient, constitutive, high expression level, cloning vector	Promega
pBScript vector	2958 bp, Amp <sup>r</sup> , cloning vector	Agilent technologies
pCR2.1-TOPO	3908 bp, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , cloning vector	Thermo Scientific
pCRII	3971 bp, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , cloning vector	Thermo Scientific
pQE30	Amp <sup>r</sup> , ColE1 replicon, HIS6 expression vector	Qiagen
pAZIL	Em <sup>r</sup> , shuttle cloning vector	LMBP 9596
pALb35	pAZILSJ derivative carrying 11377 bp SacI fragment of pNJ1 plasmid from BGNJ1-64	Mijlkovic et al., 2015
pAggLbXS	<i>XbaI-SalI</i> fragment from pALb35 cloned in pAZIL vector	This study
pBS-XP	First part of <i>aggLb</i> cloned as <i>XbaI-PstI</i> into pBluescript vector	This study
pCR-XP	First part of <i>aggLb</i> cloned as <i>XbaI-PstI</i> into pCR2.1-TOPO vector	This study
pBS-PS	Second part of <i>aggLb</i> cloned as <i>PstI-SalI</i> into pBluescript vector	This study
pBS-XP-1	pBS-SP were partially digested with <i>HindIII</i> restriction enzyme and ligated (without 1461, 820, and 821 bp)	This study
pBS-XP-4	The same as pBS-XP	This study
pCR-XP-2	pCR-XP were partially digested with <i>SspI</i> restriction enzyme and ligated (without 630 and 1611 bp)	This study
pCR-XP-3	pCR-XP were partially digested with <i>SspI</i> restriction enzyme and ligated (without 1611 bp)	This study
pBS-PS-A	The same as pBS-PS (aforementioned)	This study
pBS-PS-B	pBS-PS were partially digested with <i>HindIII</i> restriction enzyme and ligated (without both fragments of 1410 bp)	This study
pBS-PS-C	pBS-PS were partially digested with <i>HindIII</i> restriction enzyme and ligated (without 846 and both fragments of 1410 bp)	This study
pBS-PS-D	pBS-PS were partially digested with <i>HindIII</i> restriction enzyme and ligated (without both fragments of 1410 and 1266 bp)	This study
pBS-PS-E	pBS-PS were partially digested with <i>HindIII</i> restriction enzyme and ligated (without 846, both fragments of 1410 and 1266 bp)	This study
pBS-PI4E	<i>XbaI/PstI</i> fragment from pBS-XP-4 pooled with <i>PstI-SalI</i> fragment from pBS-PS-E, used pBScript vector	This study

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Strain	General characteristics	Source or reference
pBS-PI3C	<i>XbaI/PstI</i> fragment from pCR-XP-3 pooled with <i>PstI-SalI</i> fragment from pBS-PS-C, used pBScript vector	This study
pBS-PI3D	<i>XbaI/PstI</i> fragment from pCR-XP-3 pooled with <i>PstI-SalI</i> fragment from pBS-PS-D, used pBScript vector	This study
pBS-PI3E	<i>XbaI/PstI</i> fragment from pCR-XP-3 pooled with <i>PstI-SalI</i> fragment from pBS-PS-E, used pBScript vector	This study
pBS-PI2B	<i>XbaI/PstI</i> fragment from pCR-XP-2 pooled with <i>PstI-SalI</i> fragment from pBS-PS-B, used pBScript vector	This study
pBS-PI2D	<i>XbaI/PstI</i> fragment from pCR-XP-2 pooled with <i>PstI-SalI</i> fragment from pBS-PS-D, used pBScript vector	This study
pBS-PI2E	<i>XbaI/PstI</i> fragment from pCR-XP-2 pooled with <i>PstI-SalI</i> fragment from pBS-PS-E, used pBScript vector	This study
pBS-PI1A	<i>XbaI/PstI</i> fragment from pBS-XP-1 pooled with <i>PstI-SalI</i> fragment from pBS-PS-A, used pBScript vector	This study
pBS-PI1D	<i>XbaI/PstI</i> fragment from pBS-XP-1 pooled with <i>PstI-SalI</i> fragment from pBS-PS-D, used pBScript vector	This study
pBS-PI1E	<i>XbaI/PstI</i> fragment from pBS-XP-1 pooled with <i>PstI-SalI</i> fragment from pBS-PS-E, used pBScript vector	This study
pAZIL-pSE	Lactococcal promoter <i>P<sub>l</sub>sbB</i> was cloned into pAZIL vector together with leader sequence of <i>aggLb</i> gene as <i>SacI-EagI</i> fragment	This study
pPIAggLb	<i>EagI-SalI</i> fragment cloned from pALb35 into pAZIL-pSE construct	This study
pPI4E	<i>EagI-SalI</i> fragment cloned from pBS-PI4E into pAZIL-pSE construct	This study
pPI3C	<i>EagI-SalI</i> fragment cloned from pBS-PI3C into pAZIL-pSE construct	This study
pPI3D	<i>EagI-SalI</i> fragment cloned from pBS-PI3D into pAZIL-pSE construct	This study
pPI3E	<i>EagI-SalI</i> fragment cloned from pBS-PI3E into pAZIL-pSE construct	This study
pPI2B	<i>EagI-SalI</i> fragment cloned from pBS-PI2B into pAZIL-pSE construct	This study
pPI2D	<i>EagI-SalI</i> fragment cloned from pBS-PI2D into pAZIL-pSE construct	This study
pPI2E	<i>EagI-SalI</i> fragment cloned from pBS-PI2E into pAZIL-pSE construct	This study
pPI1A	<i>EagI-SalI</i> fragment cloned from pBS-PI1A into pAZIL-pSE construct	This study
pPI1D	<i>EagI-SalI</i> fragment cloned from pBS-PI1D into pAZIL-pSE construct	This study
pPI1E	<i>EagI-SalI</i> fragment cloned from pBS-PI1E into pAZIL-pSE construct	This study
pCRII-KPI	First part of KPPvScl cloned as PCR fragment into pCRII vector	This study
pKP-Lb	Hybrid clone; consisting of first part of <i>aggLb</i> gene as <i>PvuI-PstI</i> fragment and second part of <i>aggLb</i> gene as <i>PstI-SalI</i> fragment into pAZIL vector	This study
pQE <sub>30</sub> -AggBS	Fusion His-tagged part of AggLb protein into pQE <sub>30</sub> expression vector; in order to production of polyclonal antibody	This study

cells, gravitated to the bottom of the tube, forming a precipitate and leaving clear supernatant.

The auto-aggregation ability of the selected strains and derivatives was tested according to Garcia et al. (2014) with minor modifications. Briefly, cells of overnight culture were harvested by centrifugation (5000 × *g*, 10 min, 4°C), washed twice with phosphate-buffered saline – PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, pH 7.1) and resuspended in the same buffer. The mixture was vortexed and incubated at 30°C for a period of 5 h. Absorbance (OD<sub>600</sub>) was measured at different time points. Percentage of auto-aggregation was determined using the equation:  $[1 - (A_t/A_0) \times 100]$  where  $A_t$  represents the absorbance at different time points (1, 2, 3, 4 and 5 h) and  $A_0$  is absorbance at time 0. Auto-aggregation assay was done in three independent experiments. Data are presented as average of absorbance values from three independent experiments per each strain. The significance was determined by Student's *t*-test.

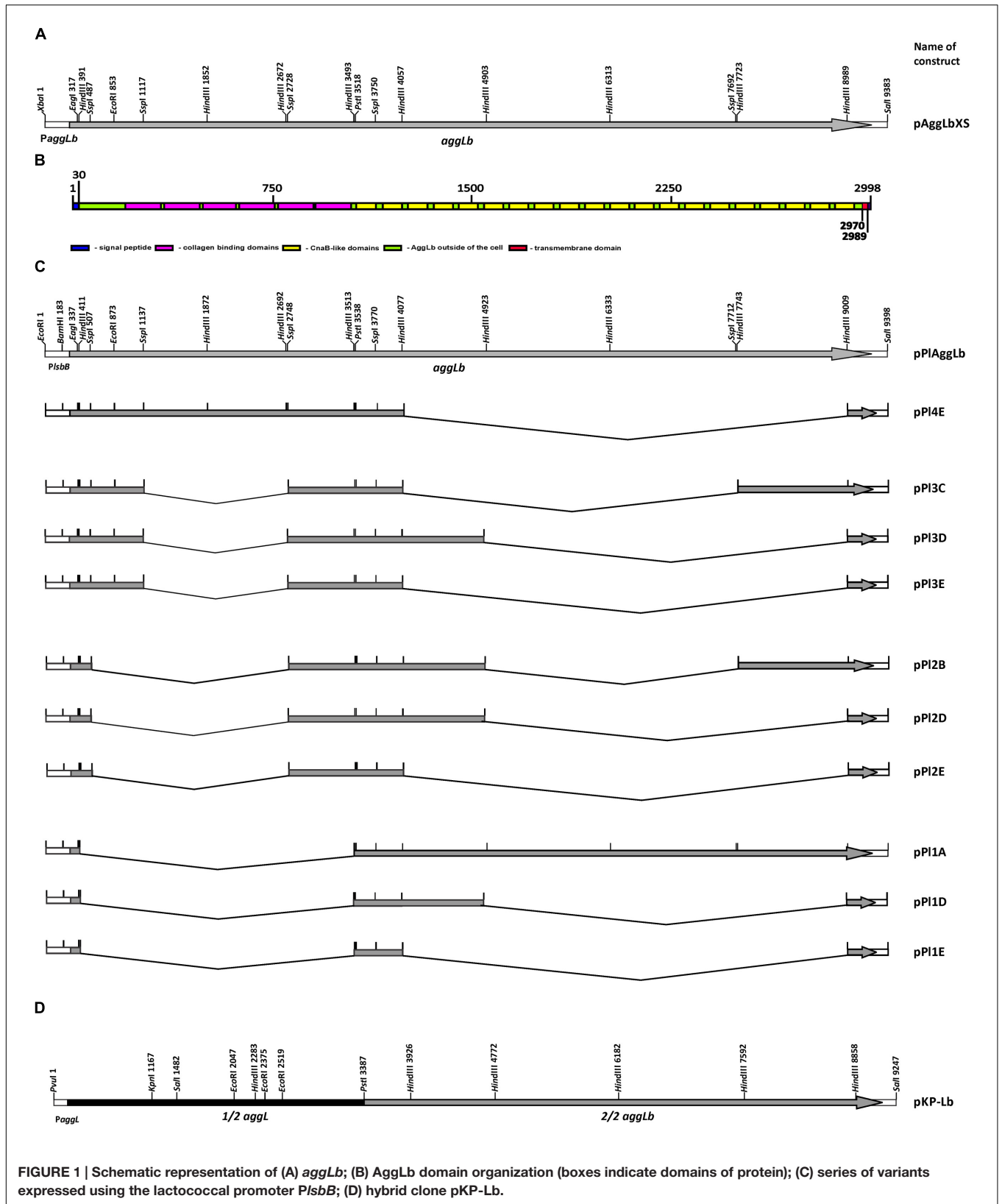
## Biofilm Formation Assay

The ability of selected strains and derivatives to form biofilm was assayed in microtiter plates as previously described by Peter et al. (2013). *P. aeruginosa* PAO1 and *E. coli* DH5α were used as positive and negative control strains, respectively. Additionally, PBS buffer was included to ensure that the influence on biofilm formation by strains (resuspended in the same buffer) not attributed to a non-specific binding effect to crystal violet. The

results are presented as average of absorbance values from three independent experiments per each strain. The significance was determined by Student's *t*-test.

## Collagen and Fibronectin Binding Assays

The wells of Maxisorb plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with type I collagen (from rat tail, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, United States; 100 μg/ml) and human fibronectin (Serva, Heidelberg, Germany; 100 μg/ml) for 16 h at 4°C. The collagen binding ability of the selected strains and derivatives was tested according to Miljkovic et al. (2015), while the ability of tested strains and derivatives to bind to fibronectin was assayed as previously described by Ahmed et al. (2001). After immobilization, wells were washed with PBS and blocked with 2% BSA in PBS. Upon removal of BSA solution and washing wells with PBS, the test cultures (100 μl, 10<sup>8</sup> CFU/ml) were added and plates were incubated on an orbital platform shaker for 2 h at 37°C. Non-adherent cells were removed by washing the wells three times with 200 μl of PBS. The adhered cells were fixed at 60°C for 20 min and stained with crystal violet (100 μl/well, 0.1% solution) for 45 min. Wells were subsequently washed three times with PBS to remove the excess stain. The stain bound to the cells was dissolved by 100 μl of citrate buffer (pH 4.3). The absorbance was measured at 570 nm, after 45 min, using the microtiter plate reader. Collagen and fibronectin binding was assayed as described above and the average of absorbance



**FIGURE 1 |** Schematic representation of (A) *aggLb*; (B) AggLb domain organization (boxes indicate domains of protein); (C) series of variants expressed using the lactococcal promoter *PisbB*; (D) hybrid clone pKP-Lb.



values from three independent experiments per each strain was presented. The significance was determined by Student's *t*-test.

## Determination of Relationships between Auto-Aggregation, Collagen/Fibronectin Binding, and Biofilm Ability of Transformants Carrying Different Variants of the *aggLb* Gene

Plots of correlation were produced using Python 2.7.8 and *scipy* library (version 0.14.0).

## Production of Polyclonal Antibody

Since whole AggLb protein was not able to be expressed in *E. coli* the part of AggLb protein containing the inter region of 190 amino acids between collagen binding and CnaB-like domains (from 1096 aa to 1286 aa) present in all variants was expressed using pQE<sub>30</sub> vector with 6 × His tag (Qiagen) for production of anti-AggLb polyclonal antibody. Using clone pALb35 (Miljkovic et al., 2015), *Hind*III fragment of 560 bp containing *Pst*I restriction site was cloned into pBScript. This fragment was recloned from pBScript vector as *Bam*HI/*Sal*I in frame into expression vector pQE<sub>30</sub> with 6 × His tag (pQE<sub>30</sub>-AggBS). Fusion His-tagged protein was expressed in *E. coli* M15 cells. His-tag affinity purification of part of AggLb protein was conducted under denaturing conditions: the refolding method using urea to disrupt non-covalent bonds and increase protein solubility was used to solubilise and make the His-tagged AggLb more accessible to the nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin. Purification of the fusion protein was applied according to protocol recommended by The QIAexpressionist. The eluted protein was dialyzed by ultrafiltration (Centrifugal Filter Units, Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices, 3K, Millipore). Polyclonal antibodies were produced by immunization of mice with the synthetic or purified fusion proteins in animal house of ICGEB, Trieste, Italy.

## Dot Blotting

Samples (2 μl of serial dilutions of total proteins dissolved in buffer which contains: 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8.0) were loaded into a PVDF membrane (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) by directly spotted on membrane as described by Niedergang et al. (2000). The same quantity of non-diluted samples was loaded on PAGE-SDS gel stained with Coomassie brilliant blue (Supplementary Figure 2). Membrane was incubated with 10% skim milk diluted in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) over night at 4°C in order to block non-specific reactions. Following blocking, the membrane was incubated 1 h at room temperature with gentle agitation in dilutions of primary antibody (mouse polyclonal antibody anti-AggLb-Ab). Primary antibodies were diluted in 5% skim milk diluted in TBS-T. After washing three times in TBS-T for 15 min, membrane was incubated for 1 h with horseradish peroxidase-labeled anti-mouse IgG (A9044 anti-mouse; Sigma, Germany) at a 1:10000 dilution in 5% skim milk diluted in TBS-T. The blots were

washed three times in TBS-T for 15 min. Spots were detected using EMD Millipore Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (ECL; Fisher Scientific, USA) following the manufacturer's instructions.

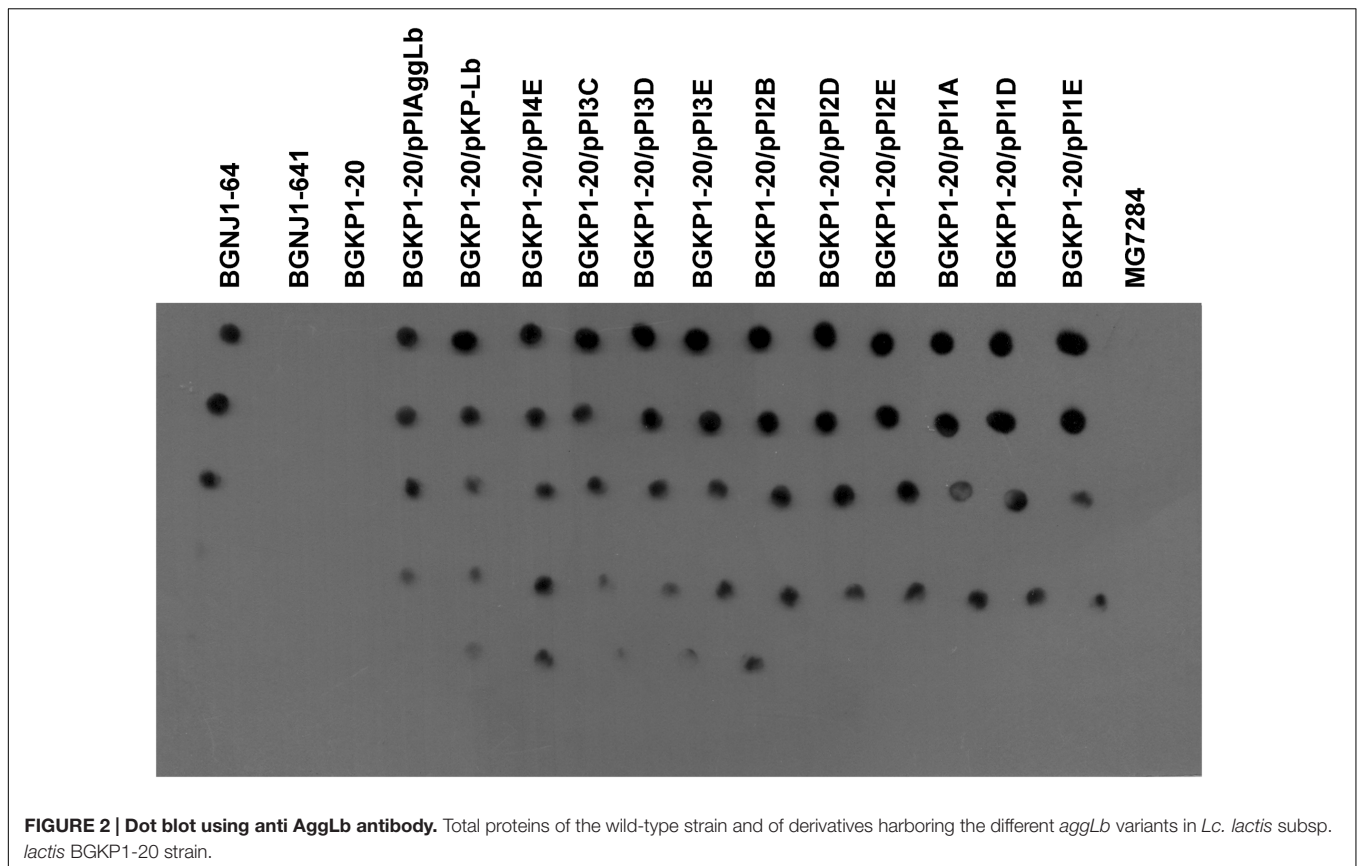
## RESULTS

### Construction of the AggLb Variants

We performed functional studies of the various domains of the AggLb protein. To produce many different domain variants of the AggLb protein, the *aggLb* gene was subcloned into two parts *Sac*I-*Pst*I and *Pst*I-*Sal*I fragments, using the pBScript vector. Both cloned fragments first partially digested using the *Hind*III restriction enzyme, and the first part of the gene was also digested using *Ssp*I; importantly, both of these enzymes leave the residual *aggLb* gene in frame. After obtaining different variants of both fragments they were combined to obtain constructs with different numbers of collagen binding and CnaB-like domains. The construct pPIIE did not contain any collagen binding domains and contained only two CnaB-like domains, whereas pPIAggLb contained the complete *aggLb* gene. For details of all the constructs see **Figure 1** and **Table 1**. All the different combinations were recloned into the pAZIL vector using the lactococcal promoter *PlsbB* to provide identical transcription activity of all the constructs (Uzelac et al., 2015). The constructs (**Figure 1**; **Table 1**) were transformed into *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGKP1-20 (the lactococcal derivative BGKP1-20 was used because the original lactobacilli strains had an extremely low efficiency of transformation) and expression was analyzed by Dot blot (**Figure 2**) using an anti-AggLb antibody raised against the transitional region covering the last part of the first region and the beginning of the second subclone of AggLb because this part is present in all of the constructs. Similar expression was obtained for all of the constructs regardless of the length of the protein (34.2 kDa pPIIE, 63.9 kDa pPIID, 65.0 kDa pPIIE, 87.6 kDa pPI3E, 94.8 kDa pPI2D, 117.3 kDa pPI3D, 132.0 kDa pPI3C, 139.3 kDa pPI2B, 145.5 kDa pPI4E, 207.3 kDa pPIIA, and 318.6 kDa pPIAggLb). In addition, the hybrid molecule pKP-Lb (314.2 kDa), consisting of the first part of the lactococcal *aggL* gene from *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGKP1 (Kojic et al., 2011) as a *Pvu*I-*Pst*I fragment and a second part of the lactobacilli *aggLb* gene from *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 as a *Pst*I-*Sal*I fragment, was constructed. All of the variants constructed were used for functional assays in order to determine the role of various domains of the AggLb aggregation protein. The correct in-frame joining of all the fragments was confirmed by DNA sequencing and expression analysis using a Dot blot (**Figure 2**; Supplementary Figure 2).

### Auto-Aggregation Ability of Transformants Carrying Different Variants of the *aggLb* Gene

The auto-aggregation ability of the wild-type strain and of the derivatives harboring the different variants of *aggLb* in the *Lc.*

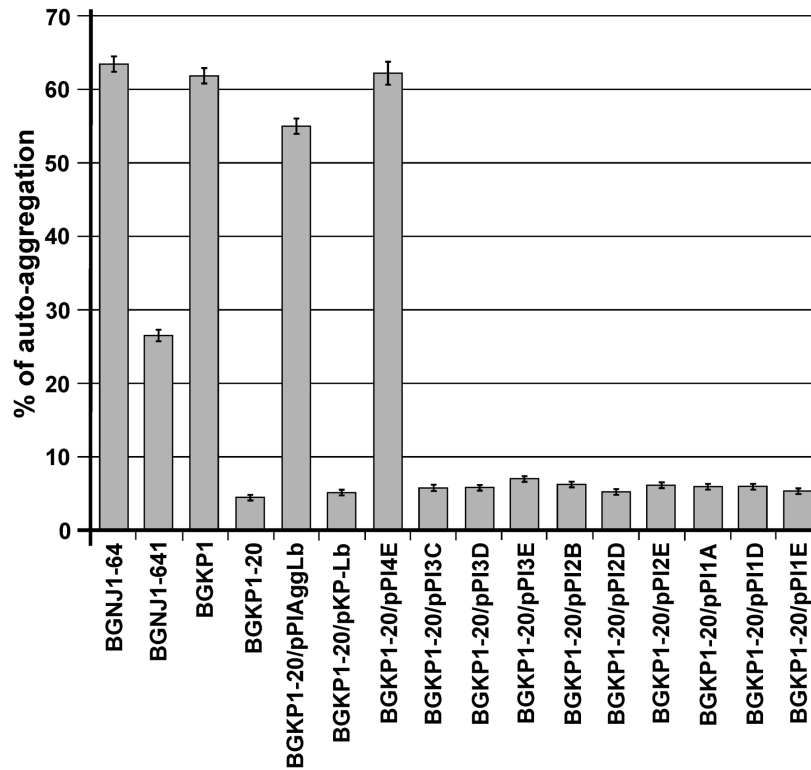


*lactis* subsp. *lactis* BGKP1-20 (see above) was measured for a period of 5 h, and the results are presented in Supplementary Table 1. We concluded that only the constructs carrying all six collagen binding domains and the first two CnaB-like domains were able to strongly auto-aggregate (BGKP1-20/pPI4E; **Figure 3**; Supplementary Table 1). Alternatively, the absence of the other CnaB-like domains, did not cause a significant effect on auto-aggregation (BGKP1-20/pPI3C, BGKP1-20/pPI3D, BGKP1-20/pPI3E, BGKP1-20/pPI2B, BGKP1-20/pPI2D, BGKP1-20/pPI2E, BGKP1-20/pPI1A, BGKP1-20/pPI1D, and BGKP1-20/pPI1E; **Figure 3**; Supplementary Table 1). It is also interesting to note that an additive effect dependent on the number of collagen binding domains on auto-aggregation was not linear, indicating that individual collagen binding domains do not have the same contribution. Careful observation revealed that the derivatives BGKP1-20/pPI2E, BGKP1-20/pPI1A, and BGKP1-20/pPI1E formed small aggregates (resembling sand or dust) that did not contribute to the rapid aggregation of the cells. Nevertheless, a negligible level of aggregation that was visible after overnight growth in a test tube was often observed in our collection of LAB. This observation may indicate a relationship between the type and number of collagen binding domains and/or CnaB-like domains within the aggregation factor(s) and the level or types of auto-aggregation. It was, therefore, concluded that the auto-aggregation ability of strains/derivatives was directly dependent on the collagen binding domains, while the 18 C-terminal CnaB-like domains were not required for

auto-aggregation. Transformants of *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGKP1-20 carrying the hybrid construct pKP-Lb composed of the first part of the *aggL* gene (carrying three collagen binding domains originating from the *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGKP1) and the second part of the *aggLb* gene were unable to form big aggregates, which indicated that the resulting hybrid molecule was not functional in strong auto-aggregation, collagen, or fibronectin binding (BGKP1-20/pKP-Lb; **Figures 3–5**) as wild-type strains (*L. paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 and/or *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGKP1).

### Collagen and Fibronectin Binding Ability of the Transformants Carrying Different Variants of the *aggLb* Gene

In our previous studies, we found that isolates carrying the *aggL* or *aggLb* genes exhibited a direct correlation between auto-aggregation and their collagen binding ability (Miljkovic et al., 2015). All domain variants of the *aggLb* gene constructed in this study were tested for the ability to bind to collagen and fibronectin. Transformants carrying the different constructs adhered to immobilized collagen (**Figure 4**) and fibronectin (**Figure 5**) to different extents. Significant differences in the adherence to immobilized collagen and fibronectin were apparent between aggregation-positive strains (*L. paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 and *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGKP1) and their aggregation-negative derivatives (*L. paracasei* subsp.



**FIGURE 3 | Comparison of the auto-aggregation ability of the wild-type strain and of derivatives harboring the different *aggLb* variants in *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGKP1-20 strain after 5 h incubation at 30°C. Auto-aggregation ability is expressed as percentages. The error bars represent standard deviations of three independent observations.**

*paracasei* BGNJ1-641 and *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGKP1-20) and also between strains carrying the first part of the *aggLb* gene (consisting of six collagen binding domains and the first two CnaB-like domains; BGKP1-20/pPIAggLb, BGKP1-20/pPI4E) and those variants that had only two or fewer collagen binding domains; these results indicate a role of the collagen binding domains in the interaction with collagen and fibronectin, but the last 18 CnaB-like domains are not indispensable (Figures 4 and 5). As observed in other experiments reported in this study (see above), we noticed that the additive effect dependent on the number of collagen binding domains was much lower than the impact of the specific collagen binding domains (II, III, and IV). The specific binding of AggLb to collagen and fibronectin was dependent on the collagen binding domains in a manner similar to the auto-aggregation ability. It appears that all the three phenotypes (auto-aggregation, collagen and fibronectin binding) are determined by the presence of the same structures of the AggLb protein such as the collagen binding domains.

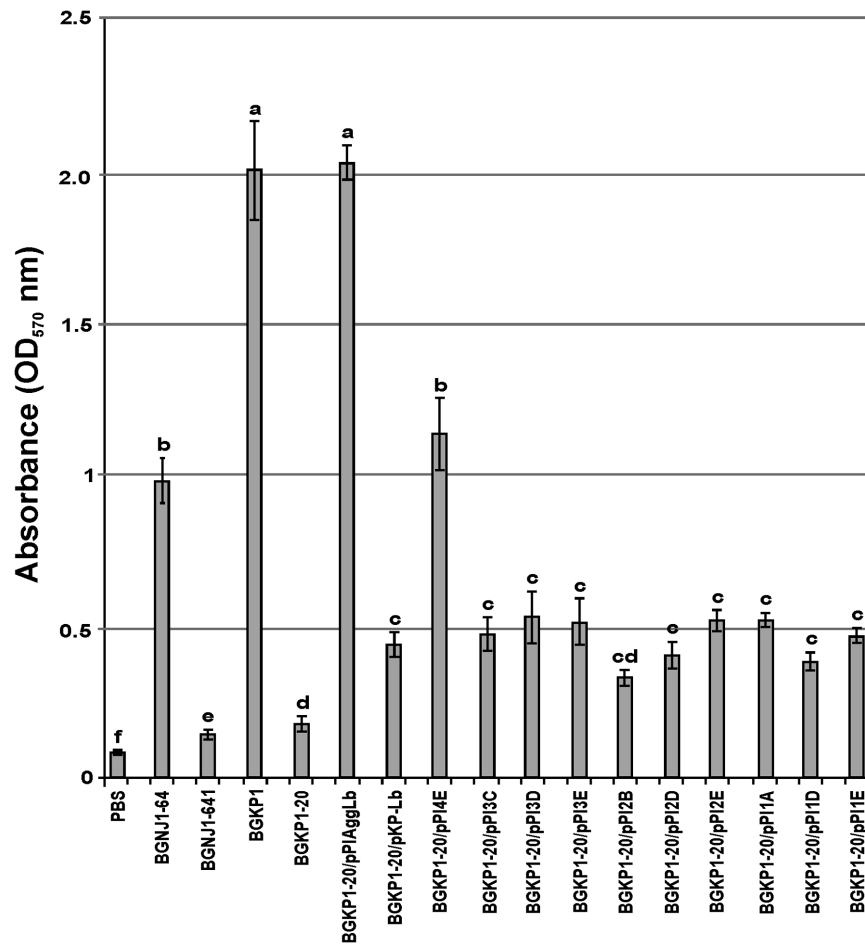
### Biofilm Formation of the Transformants Carrying Different Variants of the *aggLb* Gene

We determined the role of the AggLb in biofilm formation. Its ability to form biofilms was tested in the wild-type strain, aggregation deficient derivatives and transformants carrying

different variants of *aggLb* using the adherence of the cells to the surfaces of microtiter plates. The strongest biofilm formation was observed for the transformant carrying the construct pPI2D, followed by pPI3C, pPI3D, and finally, pPI3E (Figure 6). A comparative analysis of the variants led to the conclusion that the biofilm formation ability has a negative correlation with auto-aggregation, collagen, and fibronectin binding. It appears that the presence of collagen binding domains determines the formation of certain structures on AggLb that play a role in the interaction with collagen and fibronectin, but simultaneously enable the cells to auto-aggregate (pPI4E). Most likely, the absence of the collagen-binding domain (especially II, III, and IV) allows other structures to come to the fore (i.e., they are unmasked) which promotes biofilm formation. The difference between pPI1D and pPI2D is limited to the presence of a sixth collagen binding domain of AggLb in pPI2D (Figure 1; Table 2); thus, this result indicates that this domain is probably required in combination with the other domain(s) to allow biofilm formation.

### Relationships between Collagen/Fibronectin Binding and Biofilm Ability of Transformants Carrying Different Variants of the *aggLb* Gene

We established correlations between auto-aggregation, collagen/fibronectin binding and biofilm formation ability



**FIGURE 4 | Graphical presentation of results obtained in collagen-binding assay of selected strains and derivatives to immobilized collagen in microtiter plates.** Results were expressed as average of normalized  $A_{570}$  values. The error bars show the standard deviations. In each column, the values with different superscript letters differ significantly ( $p < 0.001$ ).

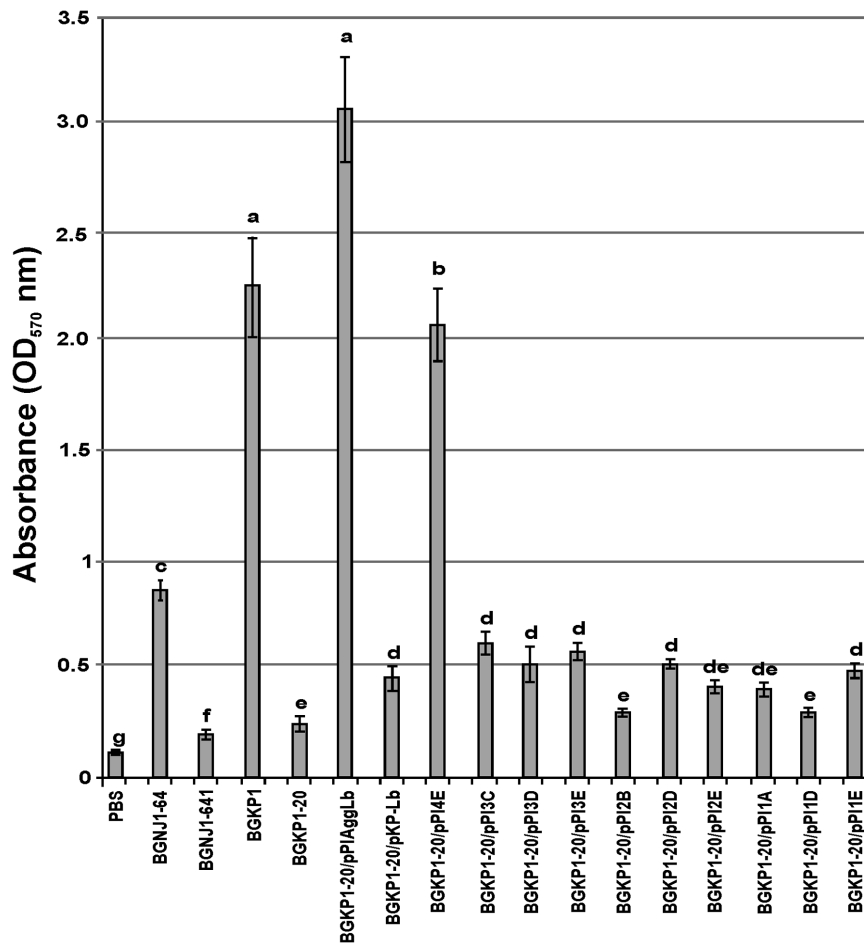
of transformants carrying different variants of the *aggLb* gene. A comparative analysis of the variants led to the conclusion that the biofilm formation ability has a negative correlation with auto-aggregation –  $R^2$  squared 0.312 (Supplementary Figure 3A), binding to collagen –  $R^2$  squared 0.260 (Supplementary Figure 3B), binding to fibronectin –  $R^2$  squared 0.242 (Supplementary Figure 3C). In addition using Python 2.7.8 and scipy library (version 0.14.0) we proved positive correlation between auto-aggregation and collagen binding –  $R^2$  squared 0.652 (Supplementary Figure 3D) and aggregation and fibronectin binding –  $R^2$  squared 0.636 (Supplementary Figure 3E).

## DISCUSSION

The adhesion of lactic acid bacteria to epithelial and mucosal surfaces is thought to be a rather complex process involving many different factors (Buck et al., 2005). The ability of lactobacilli to aggregate has been linked to their role as probiotic

factors (Garcia et al., 2014). The data of the literature suggest that the Apf-like proteins may contribute to the survival of *L. acidophilus* during its transit through the digestive tract and, potentially, may participate in the interactions with the host intestinal mucosa (Goh and Klaenhammer, 2010). Considering the importance of aggregation phenomena for human health, the experiments described in this study were mainly focused to determine the contribution of the different domains and repeats of the AggLb protein on the modulation of the aggregation phenotype. Additionally, our results have proven the existence of a direct relationship between strong auto-aggregation, collagen or fibronectin binding and biofilm formation.

Biofilms of lactobacilli can be found in many natural environments (Lebeer et al., 2007). Because the gastrointestinal tract is an important target for probiotics, some factors related to this niche have been investigated in the past decade. It was of interest to study the possible relationship between aggregation ability and biofilm formation. It has been reported that the agglutination protein AggA is required for the aggregation and increased biofilm formation of a hyper-aggregating mutant



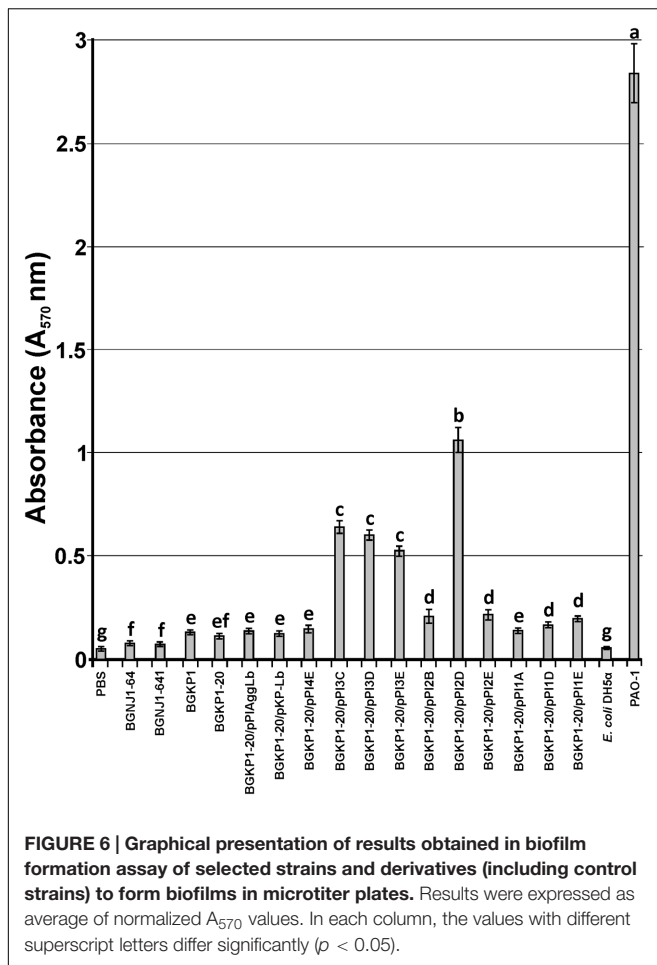
**FIGURE 5 | Graphical presentation of results obtained in fibronectin-binding assay of selected strains and derivatives to immobilized fibronectin in microtiter plates.** Results were expressed as average of normalized A<sub>570</sub> values. The error bars show the standard deviations. In each column, the values with different superscript letters differ significantly ( $p < 0.001$ ).

of *Shewanella oneidensis* MR-1 (De Windt et al., 2006). An insertional mutant of *aggA* resulted in the loss of aggregation properties and ability to form a biofilm. Additionally, the SasC protein of a pathogenic *S. aureus* strain was involved in cell aggregation, biofilm formation and colonization during infection. The N-terminal domain of the SasC protein was involved in the production of large cell aggregates, in the attachment to polystyrene, and in increased biofilm formation (Schroeder et al., 2009). Aggregation and biofilm formation are multicellular processes that allow a community to be more resistant to stress conditions. Given that these are similar processes, it is not surprising that the same protein may be involved in both functions. Since biofilm formation is important in food spoilage and pathogenic bacteria because it results in high resistance to different treatments, it is important to identify and characterize the active components that could inhibit bacterial biofilm formation (Söderling et al., 2011; Furukawa, 2015).

The ability to strongly aggregate and adhere to collagen and fibronectin is inversely correlated with the biofilm formation,

(if the ability to strongly aggregate and bind collagen and fibronectin is stronger the ability of biofilm formation is less; **Figures 3–5**; Supplementary Figure 3). Therefore, it seems that the lack of collagen binding domains II, III, and IV in the AggLb protein results in the reduced auto-aggregation, collagen and fibronectin binding and increases the propensity of the cells to form a biofilm. A comparative regression analysis of AggLb variants containing a constant number of CnaB-like domains and a different number of collagen binding domains (pPI4E, pPI3E, pPI2E, and pPI1E; pPI3D, pPI2D, and pPI1D; **Figures 4 and 5**) showed a correlation of binding to collagen or fibronectin, and an increase in biofilm formation (Supplementary Figure 3).

Our results indicate that the region responsible for the strong auto-aggregation, collagen and fibronectin binding is located on the N-terminus of the AggLb aggregation protein; transformants that carried the construct pPI4E, which contained only the N-terminal part, exhibited a strong aggregation capability, as did as clones that harbored the complete gene. Deletion studies of the AggLb protein showed that all three



**TABLE 2 | Representation of domain organization series of AggLb variants.**

Name of construct	No. of collagen binding domains	No. of CnaB like domains	Molecular mass of expressed protein (kDa)
pPIAggLb	6	20	318.6
pPI4E	6	2	145.5
pPI3C	2 (hybrid of I-V, and VI)	7	132.0
pPI3D	2 (hybrid of I-V, and VI)	5	117.3
pPI3E	2 (hybrid of I-V, and VI)	2	87.6
pPI2B	1 + 1/2 (1/2 of V and VI)	10	139.3
pPI2D	1 + 1/2 (1/2 of V and VI)	5	94.8
pPI2E	1 + 1/2 (1/2 of V and VI)	2	65.0
pPI1A	0	20	207.3
pPI1D	0	5	63.9
pPI1E	0	2	34.2

functions dependent on the collagen binding domains II, III, and IV, and their deletion leads to a complete loss of strong aggregation ability. These three domains are critical for function of AggLb in strong auto-aggregation, binding to collagen and fibronectin, either through direct and specific interaction with proteins of the matrix or by changing the properties of the cell surface. Multiple CnaB-like domains

likely function as an antenna which exposes the collagen binding domains to the surface to improve target protein interactions. The CnaB-like domains in AggLb cannot be considered as the domains responsible for the direct interaction with collagen or fibronectin, but they can strengthen the interaction between the collagen binding domains and collagen or fibronectin. Also, we noted that because the first and last CnaB-like domains had sequence heterogeneity compared to the other 18 domains, it is possible they may have a different but not strong effect on AggLb function. We can conclude that the presence of the collagen binding domains predominantly determined the adhesive function of the AggLb protein. In addition, combination of domains from lactobacilli (AggLb) and lactococci (AggL; hybrid molecule – BGKP1–20/pKP-Lb) did not result in functional protein in strong auto-aggregation, collagen, or fibronectin binding. The results obtained in this study have demonstrated that a protein may exert different functions depending on physicochemical properties of the bacterial surfaces, and this probably depends on the structure and conformation variants of AggLb. The removal of certain domain(s) not only eliminated certain functions but also resulted in other domain(s) coming to the fore and allowing the protein to assume another function. In our previous publication we have noticed one strain BGGR2-68 that simultaneously exhibits both functions strong auto-aggregation and biofilm formation (Miljkovic et al., 2015). It would be interesting to determine whether these two functions in this strain are associated with one the same protein or independent. This will be the subject of further research.

These results bolster the hypothesis that in the *S. aureus* collagen-binding Cna protein, the collagen binding A region is responsible and sufficient for collagen binding, while the B region aids as a “stalk” that projects the A region from the bacterial surface to facilitate the bacterial adherence to collagen. Such a B region assembly could result in flexibility, stability, and positioning the ligand-binding A region away from the bacterial cell surface (Furukawa, 2015). The difference between AggLb and the Cna protein is that the aggregation promoting factor contains repetitive collagen binding domains (six very heterogeneous units with less than 26% identity) that have different contributions to strong auto-aggregation, collagen, and fibronectin binding (II, III, and IV showed the most significant effects), as well as to biofilm formation. It is important to note that even if AggLb is composed of two collagen binding domains, it is not able to provide strong auto-aggregation. In contrast in Cna, this is accomplished with a single domain, indicating that it is important which of the domains is/are present.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MK conceived, designed, and coordinated this study, interpreted all of results and contributed to the preparation of the figures and wrote this paper. MM designed, performed, analyzed the experiments and wrote this paper. BJ and KN provided

experimental assistance and contributed to the preparation of the figures. IB performed one part of experiments of production polyclonal antibody. DF and VV provided technical assistance and contributed to the preparation of this paper. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

## FUNDING

The Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia, Republic of Serbia (Grant No. 173019), supported this work.

## REFERENCES

- Ahmed, S., Meghji, S., Williams, R. J., Henderson, B., Brock, J. H., and Nair, S. P. (2001). *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect. Immun.* 69, 2872–2877. doi: 10.1128/IAI.69.5.2872-2877.2001
- Bolduc, G. R., and Madoff, L. C. (2007). The group B streptococcal alpha C protein binds alpha1beta1-integrin through a novel KTD motif that promotes internalization of GBS within human epithelial cells. *Microbiology* 153, 4039–4049. doi: 10.1099/mic.0.2007/009134-0
- Boris, S., Suárez, J. E., and Barbés, C. (1997). Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *J. Appl. Microbiol.* 83, 413–420. doi: 10.1046/j.1365-2672.1997.00250.x
- Bron, P. A., Granette, C., Mercenier, A., de Vos, W. M., and Kleerebezem, M. (2004). Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice. *J. Bacteriol.* 186, 5721–5729. doi: 10.1128/JB.186.17.5721-5729.2004
- Buck, B. L., Altermann, E., Svingerud, T., and Klaenhammer, T. R. (2005). Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8344–8351. doi: 10.1128/AEM.71.12.8344-8351.2005
- Chen, X., Xu, J., Shuai, J., Chen, J., Zhang, Z., and Fang, W. (2007). The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 307–312. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.007
- De Windt, W., Gao, H., Kromer, W., van Damme, P., Dick, J., Mast, J., et al. (2006). AggA is required for aggregation and increased biofilm formation of a hyper-aggregating mutant of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Microbiology* 152, 721–729. doi: 10.1099/mic.0.28204-0
- Deivanayagam, C. C., Rich, R. L., Carson, M., Owens, R. T., Danthuluri, S., Bice, T., et al. (2000). Novel fold and assembly of the repetitive B region of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding surface protein. *Structure* 15, 67–78. doi: 10.1016/S0969-2126(00)00081-2
- Flock, J. I. (1999). Extracellular-matrix-binding proteins as targets for the prevention of *Staphylococcus aureus* infections. *Mol. Med. Today* 5, 532–537. doi: 10.1016/S1357-4310(99)01597-X
- Furukawa, S. (2015). Studies on formation, control and application of biofilm formed by food related microorganisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 1050–1056. doi: 10.1080/09168451.2015.1018126
- Galli, D., Lottspeich, F., and Wirth, R. (1990). Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol. Microbiol.* 4, 895–904. doi: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb00662.x
- García-Cayuela, T., Korany, A. M., Bustos, I., Gómez de Cadiñanos, L. P., Requena, T., Peláez, C., et al. (2014). Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Res. Int.* 57, 44–50. doi: 10.1016/j.foodres.2014.01.010
- Gasson, M. J. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154, 1–9.
- Giraffa, G. (2014). *Lactobacillus helveticus*: importance in food and health. *Front. Microbiol.* 5:338. doi: 10.3389/fmicb.2014.00338
- Goh, Y. J., and Klaenhammer, T. R. (2010). Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5005–5012. doi: 10.1128/AEM.00030-10
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580. doi: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8
- Holo, H., and Nes, I. F. (1989). High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3119–3123.
- Hungin, A. P., Mulligan, C., Pot, B., Whorwell, P., Agreus, L., Fracasso, P., et al. (2013). Systematic review: probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms in clinical practice—an evidence-based international guide. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 38, 864–886. doi: 10.1111/apt.12460
- Hymes, J. P., Johnson, B. R., Barrangou, R., and Klaenhammer, T. R. (2016). Functional analysis of an S-layer-associated fibronectin-binding protein in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 2676–2685. doi: 10.1128/AEM.00024-16
- Johnson, B. R., and Klaenhammer, T. R. (2014). Impact of genomics on the field of probiotic research: historical perspectives to modern paradigms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106, 141–156. doi: 10.1007/s10482-014-0171-y
- Josefsson, E., Higgins, J., Foster, T. J., and Tarkowski, A. (2008). Fibrinogen binding sites P336 and Y338 of clumping factor are crucial for *Staphylococcus aureus* virulence. *PLoS ONE* 3:e2206. doi: 10.1371/journal.pone.0002206
- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R. J., et al. (2010). The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 199–230. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00208.x
- Kojic, M., Jovic, B., Strahinic, I., Begovic, J., Lozo, J., Veljovic, K., et al. (2011). Cloning and expression of novel lactococcal aggregation factor from *Lactococcus lactis* subsp. lactis BGKP1. *BMC Microbiol.* 11:265. doi: 10.1186/1471-2180-11-265
- Kwiecinski, J., Jin, T., and Josefsson, E. (2014). Surface proteins of *Staphylococcus aureus* play an important role in experimental skin infection. *APMIS* 122, 1240–1250. doi: 10.1111/apm.12295
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. J. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 728–764. doi: 10.1128/MMBR.00017-08
- Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Velez, M. P., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. J. (2007). Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6768–6775. doi: 10.1128/AEM.01393-07
- Lorca, G., Torino, M. I., Font de Valdez, G., and Ljungh, A. A. (2002). Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiol. Lett.* 206, 31–37. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb10982.x
- Miljkovic, M., Strahinic, I., Tolinacki, M., Zivkovic, M., Kojic, S., Golic, N., et al. (2015). AggLb is the largest cell-aggregation factor from *Lactobacillus paracasei* subsp. paracasei BGNJ1-64, functions in collagen adhesion, and pathogen exclusion in vitro. *PLoS ONE* 10:e0126387. doi: 10.1371/journal.pone.0126387
- Muñoz-Provencio, D., Pérez-Martínez, G., and Monedero, V. (2010). Characterization of a fibronectin-binding protein from *Lactobacillus casei* BL23. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1050–1059. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04508.x

## ACKNOWLEDGMENT

The authors thank to the personal of Animal House of ICGEB for excellent technical assistance during immunization of animals and blood sampling.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01422>

- Nazzaro, F., Fratianni, F., Nicolaus, B., Poli, A., and Orlando, P. (2012). The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Anaerobe* 18, 280–285. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.03.002
- Niedergang, F., Sirard, J. C., Blanc, C. T., and Kraehenbuhl, J. P. (2000). Entry and survival of *Salmonella typhimurium* in dendritic cells and presentation of recombinant antigens do not require macrophage-specific virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 14650–14655. doi: 10.1073/pnas.97.26.14650
- Oehmcke, S., Shannon, O., Mörgelin, M., and Herwald, H. (2010). Streptococcal M proteins and their role as virulence determinants. *Clin. Chim. Acta* 411, 1172–1180. doi: 10.1016/j.cca.2010.04.032
- Peter, A., Zacharia, S., and Mathew, J. (2013). Biofilm formation in enterococci from different source. *Int. J. Biopharm* 4, 140–144.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., et al. (1998). Demonstration of safety of probiotics - a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 93–106. doi: 10.1016/S0168-1605(98)00128-7
- Sanders, M. E., Guarner, F., Guerrant, R., Holt, P. R., Quigley, E. M., Sartor, R. B., et al. (2013). An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut* 62, 787–796. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302504
- Schroeder, K., Jularic, M., Horsburgh, S. M., Hirschhausen, N., Neumann, C., Bertling, A., et al. (2009). Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. *PLoS ONE* 4:e7567. doi: 10.1371/journal.pone.0007567
- Sisto, A., and Lavermicocca, P. (2012). Suitability of a probiotic *Lactobacillus paracasei* strain as a starter culture in olive fermentation and development of the innovative patented product “probiotic table olives”. *Front. Microbiol.* 3:174. doi: 10.3389/fmicb.2012.00174
- Skrzypczak, K., Gustaw, W., and Waško, A. (2015). Health-promoting properties exhibited by *Lactobacillus helveticus* strains. *Acta Biochim. Pol.* 62, 713–720. doi: 10.18388/abp.2015\_1116
- Söderling, E. M., Marttinen, A. M., and Haukioja, A. L. (2011). Probiotic lactobacilli interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation in vitro. *Curr. Microbiol.* 62, 618–622. doi: 10.1007/s00284-010-9752-9
- Styriak, I., Nemcova, R., Chang, Y. H., and Ljungh, A. (2003). Binding of extracellular matrix molecules by probiotic bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 329–333. doi: 10.1046/j.1472-765X.2003.01402.x
- Taglialegna, A., Navarro, S., Ventura, S., Garnett, J. A., Matthews, S., Penades, J. R., et al. (2016). Staphylococcal Bap proteins build amyloid scaffold biofilm matrices in response to environmental signals. *PLoS Pathog.* 12:e1005711. doi: 10.1371/journal.ppat.1005711
- Uzelac, G., Miljkovic, M., Lozo, J., Radulovic, Z., Tosic, N., and Kojic, M. (2015). Expression of bacteriocin LsbB is dependent on a transcription terminator. *Microbiol. Res.* 179, 45–53. doi: 10.1016/j.micres.2015.06.011
- Waško, A., Polak-Berecka, M., Paduch, R., and Józwiak, K. (2014). The effect of moonlighting proteins on the adhesion and aggregation ability of *Lactobacillus helveticus*. *Anaerobe* 30, 161–168. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.10.002
- Yadava, A. K., Tyagia, A., Kaushika, J. K., Saklanib, A. C., Grovera, S., and Batish, V. K. (2013). Role of surface layer collagen binding protein from indigenous *Lactobacillus plantarum* 91 in adhesion and its anti-adhesion potential against gut pathogen. *Microbiol. Res.* 168, 639–645. doi: 10.1016/j.micres.2013.05.003

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Miljkovic, Bertani, Fira, Jovic, Novovic, Venturi and Kojic. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.