

# Promjene u proteomu *Yersinia enterocolitica* nakon tretiranja kvaternim amonijevim spojevima

---

Šimić, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2024

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:861136>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-07**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju

Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Marko Šimić

**Promjene u proteomu *Yersinia enterocolitica*  
nakon tretiranja kvaternim amonijevim  
spojevima**

Diplomski rad

Izv. Prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Osijek, 2024.

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA - diplomski rad**

Naziv sveučilišta: **Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju**

Naziv studija: **Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer**

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Znanstvena grana:** Biokemija

### **Promjene u proteomu *Yersinia enterocolitica* nakon tretiranja kvaternim amonijevim spojevima**

**MARKO ŠIMIĆ**

**Rad je izrađen na:** Sveučilištu u Osijeku – Odjel za kemiju

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

**Sažetak:** Bakterija *Yersinia enterocolitica*, gram-negativni patogen koji se često prenosi hranom, testirana je s dezinficijensima na bazi kvaternih amonijevih soli. U testiranju su korištene prethodno sintetizirane kvaterne amonijeve soli s kloridnim anionom kao inhibitori. Promjene u proteomu analizirane su metodama koje koriste gelove i metodama bez gelova. Ključna uloga pripreme uzoraka posebno se ističe u proteolitičkoj digestiji. Daljnje analize provedene su tekućinskom kromatografijom povezanom sa spektrometrijom masa, a dobiveni podatci odrađeni su putem alata QuickGO i UniProt. Konačna analiza pokazala je razlike u količinama „up“ i „down“ reguliranih proteina, omogućujući uvid u promjene proteoma i ključne proteina za rast, razvoj i preživljavanje bakterije pod stresom.

**Ključne riječi :** *Yersinia enterocolitica*; kvaterne amonijeve soli; proteom; tekućinska kromatografija; spektrometrija masa; regulacija proteina.

**Jezik izvornika:** hrvatski jezik

**Diplomski rad obuhvaća:** 34 stranice, 16 slika, 5 tablica, 63 reference

**Rad prihvaćen:**

**Stručno povjerenstvo za ocjenu rada:**

- 1 izv. prof. dr. sc. Tomislav Balić
2. izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik
3. doc. dr. sc. Olivera Galović

**Rad je pohranjen:** Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, 31000 Osijek  
Repozitorij Odjela za kemiju, Osijek

## FUNDAMENTAL DOCUMENTATION CARD - Graduation thesis

University Name: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek – Department of Chemistry**

Name of study programme: **University Graduate study programme in Chemistry; research program**

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific branch:** Biochemistry

### **Proteome changes in *Yersinia enterocolitica* after treatment with quaternary ammonium compounds**

**MARKO ŠIMIĆ**

**The paper was created on:** Department of Chemistry

**Supervisor:** associate professor Ph.D. Martina Šrajer-Gajdošik

**Abstract:** The bacterium *Yersinia enterocolitica*, a gram-negative pathogen frequently transmitted through food, was tested with disinfectants based on quaternary ammonium compounds. In the testing, previously synthesized quaternary ammonium compounds with chlorides were used as inhibitors. Proteome changes were analyzed using both gel-based and gel-free methods. The crucial role of sample preparation is particularly highlighted in proteolytic digestion. Further analyses were conducted using liquid chromatography coupled with mass spectrometry, and the obtained data were processed using QuickGO and UniProt tools. The final analysis showed differences in the quantities of up- and down-regulated proteins, providing insight into proteome changes and key proteins involved in the growth, development, and survival of the bacterium under stress

**Keywords:** *Yersinia enterocolitica*; quaternary ammonium salts; proteome; liquid chromatography; mass spectrometry; protein regulation

**Original language:** Croatian language

**Thesis includes:** 34 pages, 16 figures, 5 tables, 63 references

**Thesis accepted:**

**Reviewers:**

1. associate professor Ph.D. Tomislav Balić
2. associate professor Ph.D. Martina Šrajer-Gajdošik
3. assistant professor Ph.D. Olivera Galović

**Thesis deposited in:** Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek

Repository of the Department of Chemistry, Osijek

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>2</b>
2.1. PATOGENI U HRANI.....	2
2.2. YERSINIA ENTEROCOLITICA .....	5
2.3. KVATERNE AMONIJEVE SOLI .....	9
2.4. DEZINFICIJENSI NA BAZI KVATERNIH AMONIJEVIH SOLI .....	11
2.5. REZISTENTNOST MIKROORGANIZAMA .....	13
2.6. MASENA SPEKTROMetriJA .....	15
2.7. PROTEOMIKA U ANALIZI PATOGENA HRANE .....	17
<b>3. METODE I MATERIJALI</b> .....	<b>19</b>
3.1. INHIBITORI BAKTERIJSKOG RASTA .....	19
3.2. UZGOJ BAKTERIJSKE KULTURE I ANTIBAKTERIJSKA TESTIRANJA .....	19
3.3. IZOLACIJA PROTEINA.....	20
3.4. ELEKTROFOREZA U POLIAKRILAMIDNOM GELU U DENATURIRAJUĆIM UVJETIMA.....	21
3.5. DIGESTIJA UZORAKA U GELU .....	21
3.6. TEKUĆINSKA KROMATOGRFIJA SPREGNUTA SA SPEKTROMetriJOM MASA .....	22
3.7. ONTOLOGIJA GENA.....	23
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>24</b>
4.1. INHIBITORSKO DJELOVANJE KVATERNIH AMONIJEVIH SOLI .....	24
4.2. IDENTIFIKACIJA PROTEINA I ODREĐIVANJE RAZLIKA U EKSPRESIJI .....	24
4.3. GENSKA ONTOLOGIJA.....	27
4.4. ANALIZA RAZLIČITO EKSPRIMIRANIH PROTEINA .....	29
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>33</b>
<b>6. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>34</b>

## 1. Uvod

Prema podacima Svjetske Zdravstvene Organizacije, svake godine više od dva milijuna ljudi umire zbog hrane kontaminirane patogenima [1]. Bolesti uzrokovane patogenima u hrani nastaju kada se ti mikroorganizmi umnožavaju u organizmu ili izlučuju toksine u tijelo domaćina [2]. Većina patogena koji se nalaze u hrani ulazi u ljudski organizam oralnim putem, a intoksikacija se primarno odvija u probavnom sustavu. U ovom istraživanju proučava se bakterija *Yersinia enterocolitica*, gram-negativni patogen koji uzrokuje jersiniozu, a jedna od tri bakterije iz roda *Yersinia* koje su infektivne za ljude. Prirodni domaćini *Y. enterocolitica* su svinje i perad, a infekcija kod ljudi najčešće nastaje konzumacijom mesa tih životinja koje nije dovoljno termički obrađeno. Kako bi se razumjeli mehanizmi preživljavanja, rasta i razvoja bakterije, *Y. enterocolitica* se tretira kvaternim amonijevim spojevima. Ovi spojevi pripadaju jednoj od najučinkovitijih grupa dezinficijensa i zbog svoje jednostavne i brze sinteze, često se koriste u raznim potrošačkim proizvodima. Kvaterne amonijeve soli sastoje se od pozitivno nabijenog dušika, vezanog na četiri alkilne ili arilne skupine, s jakim anionom poput klorida ili bromida. Nakon tretiranja bakterije, provedene su daljnje analize koristeći tekućinsku kromatografiju, spektrometriju masa i elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima, a dobiveni podatci analiziraju se uz pomoć programa Mascot v.2.3., ProteoIQ te internetskih alata QuickGO i UniProt. Rezultati pridonose istraživanju virulentnosti i patogenosti *Y. enterocolitica* u hrani te njenom preživljavanju u stresnim uvjetima.

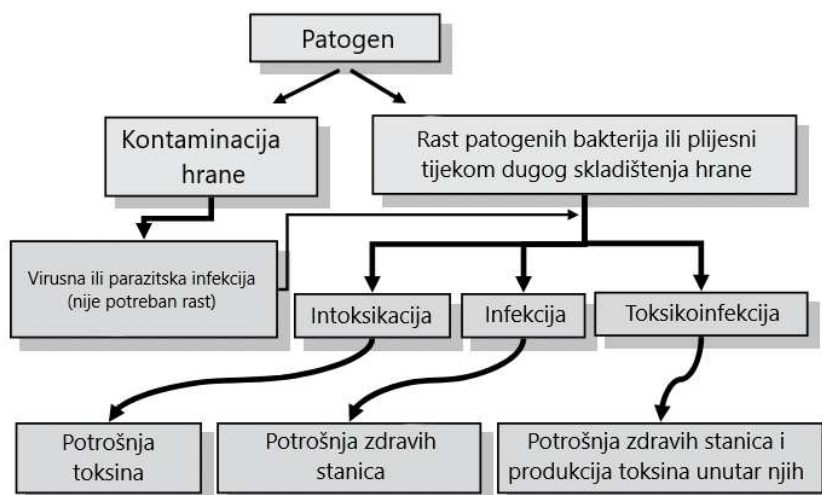
## 2. Literaturni pregled

### 2.1. Patogeni u hrani

Prema dostupnim rezultatima arhiva Svjetske Zdravstvene Organizacije (engl. *World Health Organization, WHO*) dokazano je da godišnji broj smrtnih slučajeva prouzročen kroničnom dijarejom uzrokovanom hranom ili vodom koja je kontaminirana iznosi približno 2 milijarde od kojih jednu trećinu čine djeca ispod pet godina starosti [1]. Patogeni i njihovi toksini glavni su odgovorni za bolesti i simptome dijareje, dehidracije, mučnine, povraćanja, vrućice i dr. te eventualne smrti prouzrokovane konzumacijom kontaminirane hrane [2]. Patogeni koji se prenose hranom dijele se na viruse (npr. hepatitis A, norovirus), patogene bakterije (npr. *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*) i protoze (npr. *Cyclospora cayentanensis*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis*) [2].

Patogeni koji se prenose hranom direktna su poveznica između konzumirane hrane i zdravstvenog stanja organizma. Naime, uz razvijanje novih propisa o kontroli kvalitete hrane kao i novih tehnologija za sprječavanje kontaminacije iste, patogeni nastavljaju uzrokovati bolesti i razne infekcije među populacijom dok u ekonomskom smislu mogu prouzročiti velike troškove proizvođaču određenog prehrambenog proizvoda. Osim razvoja novih tehnologija i velikog broja propisa za kontrolu kvalitete, patogeni su pridonijeli razvitku mnogobrojnih probiotika čiji se utjecaj na zdravlje organizma odražava u poboljšanoj probavi, poboljšanoj apsorpciji nutrijenata, jačanju crijevne mikroflore, modulaciji imunološkog podražaja te otpornosti ka patogenima [3]. Patogeni, kao i toksini koje otpuštaju u organizam primarni su razlog razvitka nekih od bolesti koje mogu izazvati širenje među populacijom (tablica 1.) [4,5].

Bolest uzrokovana kontaminiranom hranom razvija se kada patogen započne svoje višestruko umnožavanje u organizmu domaćina ili kada njegov toksin pronađe put u sustav domaćina prilikom konzumacije iste. Slijedom navedenog, zaraze hranom kontaminiranom patogenima razdvajaju se na infekcije, intoksikacije te kointoksikacije (Slika 1.) [6]. Primarna razlika između infekcijskog i intoksikacijskog mehanizma djelovanja uslijed kontaminacije organizma je inkubacijsko vrijeme koje je puno duže kod infekcijskog režima [4,5,6].



**Slika 1.** Dijagram kretanja i razvitka patogena [6]

Temeljni način dospijevanja patogena u domaćina je oralnim putem dok se umnožavanje i stvaranje infekcije, odnosno intoksikacije primarno odvijaju u probavnom traktu. Glavnina patogena nošenih hranom uzrokuje lokalne infekcije i oštećenja tkiva, međutim mogu se proširiti i na druga lokalna tkiva uzrokujući opasnu infekciju cijelog organizma koja može rezultirati smrtnim ishodom ukoliko se simptomi ne prepoznaju na vrijeme [6].

**Tablica 1.** Vrijeme inkubacije simptoma, simptomi te razlozi infekcije ili intoksikacije organizma [4]

VRIJEME POTREBNO ZA INKUBACIJU SIMPTOMA	IZRAŽENI SIMPTOMI	PATOGEN/TOKSIN
1-7 sati	Mučnina, bolovi u stomaku, dijareja	<i>Staphylococcus aureus</i> , enterotoksini
8-16 sati	Povraćanje ili dijareja, grčevi u abdomenu	<i>Bacillus cereus</i>
3-7 dana	Vrućica, dijareja, bolovi u stomaku	<i>Yersinia enterocolitica</i>
3-6 mjeseci	Nesanica, konstantna nervoza, anoreksija, gastroenteritis	<i>Taenia saginata</i> , <i>Taenia solium</i>



Za uspješnu i učinkovitu infekciju domaćina, nekoliko čimbenika mora biti u međusobnoj korelaciji. Glavna stavka za početak uspješne infekcije pojedinog organizma je količina patogena koji mora dospjeti u organizam kako bi inicijacija započela, a uz dovoljnu koncentraciju, patogeni trebaju preživjeti dovoljno dugo u raznolikom i promjenjivom okruženju kako bi se uspjeli dovoljno umnožiti te započeti širenje u tkiva [6]. Patogeni, uz oštećenja tkiva i stanica, koriste egzotoksine, endotoksine te enzime za poticanje apoptoze ili nekroze kako bi povećali šansu preživljavanja u domaćinu. Svaki patogen koji kontaminira hranu posjeduje afinitet prema određenom tkivu kojeg nastoji kolonizirati, a to je predodređeno faktorima adhezije, invazije i kemotaksije (npr. bakterije posjeduju velik afinitet prema željezu što im dopušta dopiranje do organa kao što jetra koja sadržava veliku koncentraciju transferina) [7].

Osim zaštitnih omotača koje bakterije posjeduju za preživljavanje u neprijateljski nastrojenom okruženju, bakterije iskorištavaju vlastite toksine i enzime kako bi zaustavile imunološki sustav domaćina da ih eliminira iz organizma. Uz navedene faktore, mehanizme preživljavanja te afinitete, nazočnost komenzalizma<sup>1</sup> pomaže patogenima za odabir mjesta infekcije domaćina. Na primjer, zadobivanjem rana, domaćin dolazi u kontakt s aerobnim mikroorganizmima koji rastom i razmnožavanjem stvaraju anaerobnu okolinu koja predstavlja idealni okoliš za infekciju. Primjerice, bakterija *Clostridium botulinum* kojom se može zaraziti ozljedom oštrim predmetom ili prašinom u takvim anaerobnim uvjetima stvara toksin *botulinum* inducirajući bolest botulizam [6,7,8].

Infekcija izazvana patogenom hrane započinje konzumacijom kontaminirane hrane ili pića pri čemu navedeni mikroorganizmi prolaze kroz kiseli okoliš želuca sve do početka probavnog trakta gdje se lokaliziraju, počinju umnožavati te prolaze crijevnu ovojnicu direktnom invazijom ili translociranjem pomoću fagocitirajućih M stanica [6,8]. Razina infekcije izazvana patogenim mikroorganizmima može biti podijeljena na akutnu i kroničnu. Kod akutne infekcije, bolest se naglo razvija, ali kratko traje zbog hitre obrambene reakcije imunološkog sustava dok je kod kronične infekcije bolest dugotrajna te što umanjuje učinkovitost imunološkog sustava. Odgođeni razvoj simptoma i bolesti primarno je omogućen

---

<sup>1</sup> komenzalizam (prema srednjovj. lat. *commensalis*: koji živi zajedno), udruživanje dvaju organizama (biljnih ili životinjskih), pri čemu jedan ima koristi od drugoga, a pritom ga ne oštećuje. komenzalizam. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013. – 2024. Pristupljeno 5.6.2024.

snažnim imunološkim odgovorom na infekciju, a ne samim uzročnikom bolesti, što je dokazano u slučajevima kronične šigeloze [8,9].

Osim direktnog štetnog djelovanja na domaćina, zdravlje može biti narušeno toksinima koje patogeni u hrani proizvode izazivajući otrovanje hranom ili intoksikaciju. Povišena vlaga, temperatura, vrijeme skladištenja te kisik glavne su stavke pri sintezi toksina i njihovog otpuštanja u hranu koja uslijed konzumacije dopijeva u domaćina. Prilikom digestije i neometanog prolaska kroz želudac do tankog i debelog crijeva, toksini bivaju apsorbirani kroz gastrointestinalni epitelni sloj izazivajući oštećenja i upale lokalnog tkiva s potencijalnim transportom do udaljenih organa kao što su jetra, bubrezi ili središnji živčani sustav [6,8,9].

Uz infektivni i intoksikacijski režim zaraze domaćina, pojedine bakterije koriste mogućnost toksikoinfekcije do koje dolazi uslijed koloniziranja sluznice tankog i debelog crijeva te istovremene sinteze i otpuštanja egzotoksina. Navedeni toksini imaju sposobnost djelovanja na lokalna tkiva kao i ulazak u krvotok. Poznatiji patogeni povezani s toksikoinfekcijom su *Vibrio cholerae* s toksinom kolere, *E. coli* s temperaturno stabilnim i nestabilnim toksinom te *Clostridium perfringens* s enterotoksinom [6,8].

## 2.2. *Yersinia enterocolitica*

Bakterija *Yersinia enterocolitica* poznata je kao treći najučestaliji patogen u Europskoj Uniji prenošen životinjama i hranom dobivenom njihovom preradom, uzrokujući bolesti kao što je humani nespecifični gastroenteritis, reaktivni artritis te nodozni eritem. Rasprostranjenost *Y. enterocolitica* se primarno pojavljuje među životinjama, s najčešćim prisustvom u populaciji uzgojnih svinja, ali može biti izolirana i iz drugih izvora hrane, poput mliječnih proizvoda, peradi, jaja i govedine [10].

Rod *Yersinia*, koji spada u obitelj *Enterobacteriaceae* sačinjen je od 18 patogenih Gram-negativnih bakterija. *Y. enterocolitica* jedan je od tri dokumentirana patogena iz roda *Yersinia* koji su infektivni za ljudski organizam: a) *Y. pseudotuberculosis* – patogen koji se primarno pronalazi kod sisavaca i ptica te uzrokuje enterokolitis te septikemiju; b) *Y. enterocolitica* – najčešći uzročnik bolesti kod ljudi koji uglavnom uzrokuje jerisinozu; c) *Y. pestis* - uzrokuje bolest kuge koja se prenosi kukcima kao što su buhe. *Y. pestis* jedina je od tri po čovjeka opasna patogena koja se prenosi krvnim putem, buhama te aerosolima dok se *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica* šire fekalno-oralnim putem. Ostatak bakterija iz roda *Yersinia* nisu dovoljno

proučavane te ih se smatra kao ne-infektivnim i manje opasnim bakterijskim vrstama čije je stanište primarno u vanjskom okruženju čovjeka [12].

*Y. enterocolitica* je Gram negativna bakterija koja nema sposobnost stvaranja zaštitne spore ili kapsule dok je njen oblik okarakteriziran oblikom anaerobnih štapića ili kokobacila [11]. *Y. enterocolitica* je dodatno klasificirana kao anaerobna gamaproteobakterija koja pokazuje homologiju gena DNA s ostalim pripadnicima obitelji *Enterobacteriaceae* u postotku od 6 do 26 posto, a oko 50% s *Y. pestis* i *Y. pseudotuberculosis* [12,13].

*Y. enterocolitica* je biokemijski i genetski raznolika vrsta, koja se dijeli u šest biotipova (1A, 1B, 2, 3, 4, 5) ovisno o njihovoj biokemijskoj prirodi te na više od 70 serotipova koji su ustanovljeni prema antigenskim varijacijama u „O“ antigenu endotoksinskog ili lipopolisaharidnog (engl. *lipopolysaccharide*, *LPS*) sloja bakterija [12,13]. Navedenih šest biotipova podijeljeni su na visoko i nisko virulentne. Visoko virulentnim biotipovima pripada jedino biotip 1B (poznatiji kao „američki soj“ zbog lokaliteta izolacije) dok su ostali biotipovi 2, 3, 4, 5 (poznatiji kao „europski sojevi“) te 1A biotip klasificirani kao nisko virulentni. Klasifikacija tipa virulentnosti određena je prema mogućnosti soja da usmrti pokusnog miša pri niskoj dozi. Unatoč životinjskim testiranjima, korelacija između ponašanja sojeva kod životinja (u ovom slučaju, laboratorijskih miševa) i ljudi nije ukazala na informacije koje bi razriješile intenzitet virulentnosti [12,14].

Izolacijom najvirulentnijih sojeva *Y. enterocolitica* iz zaraženih životinja i ljudi ustanovljeno je da krajnje patogeni sojevi navedene bakterije pripadaju serotipovima O:8/1B, O:3/4, O:3/3, O:9/2 te O:5.27/2 (tablica 2.). Ispitivanjima je ustanovljeno da su serotipovi O:3, O:5, O:8 i O:9 povezani s bolestima kod ljudi iako je njihova prisutnost ustanovljena i kod izoliranih nevirulentnih sojeva [11,14].

Plazmid pYV (engl. *plasmid for Yersinia virulence*, *pYV*) koji je odgovoran za virulentnost roda *Yersinia* i karakterizaciju svih virulentnih serobiotipova i gena povezanih s virulencijom, prisutan je kod svih biotipova osim kod nevirulentnog biotipa 1A [14]. Plazmid pYV povezan s virulencijom sadrži *Yersinia* sekrecijski (*Ysc*) lokus, koji kodira T3SS (sekrecijski sustav tipa III) i sastoji se od više od 20 gena te skupinu virulentnih faktora Yops (engl. *Yersinia outer-membrane proteins*). Yops proteini omogućuju patogenim bakterijama preživljavanje odgovora imunološkog sustava ometanjem, primjerice, aktinskog citoskeleta, inhibirajući fagocitozu i signalne funkcije makrofaga domaćina. Putem T3SS-a, izravno se prenose u citosol stanica domaćina, uzrokujući apoptozu i preživljavanje bakterija u domaćinu.

Plazmid pYV nosi gen koji kodira protein adhezije YadA (engl. *Yerisinia adhesion A*) koji potiče čvrsto vezivanje na proteine izvanstaničnog matriksa, kao što su fibronectin, laminin i/ili kolagen. Geni na plazmidu pYV regulirani su temperaturom i koncentracijom Ca<sup>2+</sup> iona, a optimalno su izraženi na 37°C u uvjetima niske koncentracije kalcijevih iona [11,14].

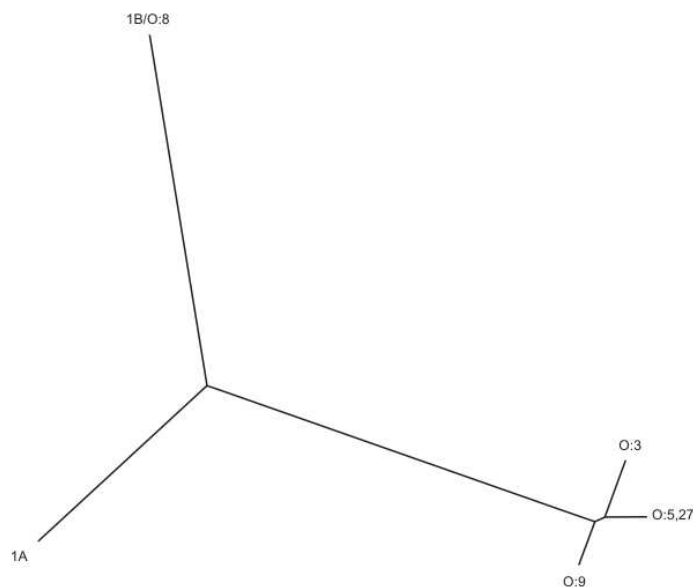
Pretpostavlja se da su se biotipovi *Y. enterocolitica* razvili evolucijskim putem iz kolektivnog pretka uslijed čega se navedeni biotipovi mogu podijeliti u tri kaskade ovisno o jačini virulentnosti na visoko virulentne, nisko virulentne i nevirulentne kaskade. Sojevi koji su klasificirani kao nisko virulentni strogo su grupirani ovisno o njihovom serotipu što je potpuno u kontrastu kod sojeva biotipova 1B i 1A (slika 2.) koji impliciraju na široke unutarkaskadne genetske razmake [15].

**Tablica 2.** Odnos biotipova, serotipova i pYV plazmida kod bakterije *Y. enterocolitica* (<sup>b</sup>serotipovi koji sadržavaju virulentni plazmid pYV) [12]

BIOTIP	POVEZNICA S BOLESTI KOD LJUDI	SEROTIP/OVI
1A	NE	O:4; O:5; O:6,30; O6,31; O:7,8; O:7,13; O:10; O:14; O:16; O:21; O:22; O:25; O:37; O:41,42; O:46; O:47; O:57
1B	DA	O:4,32 <sup>b</sup> ; O:8 ; O:13a,13b <sup>b</sup> ; O:16; O:18 <sup>b</sup> ; O:20 <sup>b</sup> ; O:21 <sup>b</sup> ; O:25; O:41,42
2	DA	O:5.27 <sup>b</sup> ; O:9 <sup>b</sup> ; O:27
3	DA	O:1,2,3 <sup>b</sup> ; O:3 <sup>b</sup> ; O:5.27 <sup>b</sup>
4	DA	O:3 <sup>b</sup>
5	DA	O:2,3 <sup>b</sup>

Bakterija *Y. enterocolitica* kao i njeni virulentni sojevi u organizam domaćina dopijevaju oralnim putem prolazeći kroz probavni trakt sve do intestinalnog tkiva tankog i debelog crijeva. Naknadno, sojevi se lokaliziraju te pokušavaju probiti mukozni sloj do limfoidnog tkiva uslijed čega dolazi do migracije u ileum i adhezije na M stanice

pozicioniranim na Peyerovim pločama<sup>2</sup> kako bi se uspješno probile kroz iste te kako bi se napale oformljene limfoidne folikule [17]. Konstantno umnožavanje patogena u sloju vezivnog tkiva koji se nalazi između tankog sloja membrana i mukoznog sloja poznatijem kao *lamina propria* dopušta bakterijski opstanak i širenje u okolne organe poput jetre, slezene te limfnih čvorova abdominalnog područja [12,17].



**Slika 2.** Filogenetsko stablo *Y. enterocolitica* koje ukazuje na evoluciju od kolektivnog pretka u tri grupacije određenih stupnja virulentnosti. 1B predstavlja grupaciju visoko virulentnih sojeva; 1A predstavlja grupaciju nevirulentnih sojeva; 2-5 biotipovi prikazani kao nisko virulentne grupacije u obliku serotipova O:3, O:9 te O:5,27 [15]

*Y. enterocolitica* je životinjski patogen koji izvorno inficira sisavce dok su ljudi nenamjerni i sporedni ciljevi zaraze. Učestalost ljudskih infekcija s *Y. enterocolitica* zabilježeno je diljem svijeta s većim intenzitetom zaraze u sjevernoj hemisferi zbog temperaturne pogodnosti prema virulentnim serobiotipovima patogena. U Europi, jersinioza zauzima treće mjesto u učestalosti bakterijskih infekcija uzrokovane konzumacijom kontaminirane hrane. Pojava jersinioze u Europi s prosječnom pojavom potvrđenih slučajeva od 1,52 na 100 000 stanovnika puno je veća u odnosu na Sjevernu i Južnu Ameriku gdje prosječna pojava potvrđenih slučajeva 0,52 na 100 000 [12,18]. Infekcija jersiniozom i samim patogenom kod ljudi je izuzetno nepravilna te izolirana na određenim mjestima, a dvije trećine oboljelih od

<sup>2</sup> Ovalne izbočine limfnoga tkiva na sluznici koje se od ostale površine razlikuju obojenjem ili građom, Lapter, V. Stomatološki leksikon. Zagreb : Globus, 1990.

infekcija čine dojenčad te djeca ispod 10 godina starosti [18]. Glavnina nositelja virulentnih sojeva patogena *Y. enterocolitica* su svinje te svinjske preradevine. Područja lokalizacije patogena kod svinja su usna šupljina, jezik, krajnici, limfni čvorovi te fekalije. U Europi, po godišnjem prosjeku, učestalost pojave jersinioze uslijed konzumacije svinjetine kontaminirane *Y. enterocolitica* u prosjeku iznosi 2,8 slučajeva na 100 000 ljudi. Nasuprot smanjenju učestalosti oboljelih od jersinioze, pojava *Y. enterocolitica* u prehrambenim proizvodima bilježi porast od 3,1% u razdoblju 2008 – 2010 [12,19,20].

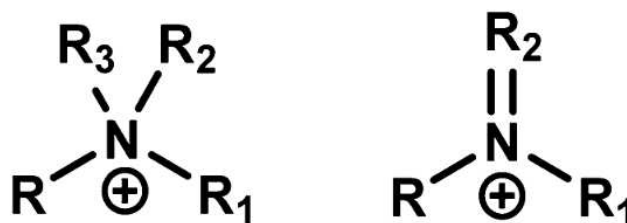
Osim jersinioze, bakterija *Y. enterocolitica* izaziva nespecifični akutni gastroenteritis, enterokolitis kao i širok spektar ekstraintestinalnih poremećaja. Ukoliko nije brzo identificirana, infekcija može ukazivati na upalu crvuljka ili Crohnov sindrom. Smatra se da je prosječna brojnost bakterija koja je potrebna da inficira ljudski organizam između  $10^4$  i  $10^6$  [21], no te vrijednosti uvelike ovise o imunitetu domaćina kao i o samoj virulentnosti soja koji napada organizam. Razvitak simptoma prilikom infekcije manifestira se između 24 i 48 sati, a glavnina simptoma koji se pojavljuju su bol povraćanje, mučnina i dijareja dok su simptomi koji najuvjerenije iskazuju na zarazu bol u abdomenu te vrućica. Ukoliko se ne formira kronično stanje bolesti, period iste traje u razdoblju od 3 dana pa sve do 2 tjedna [22]. Imunološka spremnost organizma domaćina kao i vrsta soja koja napada organizam uvelike kontrolira intenzitet infekcije. Najveću osjetljivost ka infekciji s bakterijama roda *Yersinia* podliježu vrlo mladi i stari ljudi koji podilaze imunosupresijskim tretmanima [12].

### 2.3. Kvaterne amonijeve soli

Kvaterne amonijeve soli (KAS) jedna su od najučinkovitijih grupa dezinficijensa u proteklih sto godina. Njihova laka i brza sinteza, strukturna mnogostranost te dugotrajna uporaba kroz povijest, omogućila je višenamjensku implementaciju u potrošačkim proizvodima kao i napredniji razvoj te primjenu [23]. Osim standardne nomenklature, KAS ponekad nose naziv kvaterni amonijeve kationi ili kvaterni amonijeve surfaktanti.

KAS su kemijski spojevi koji se sastoje od pozitivno nabijene dušikove „glave“ koja, kada stupi u kontakt s vodenim medijem, ima negativne učinke na sustav koji se nalazi u istom. Kvaterne amonijeve soli sadrže pozitivno nabijeni dušik koji je povezan s četiri alkilne ili arilne skupine (Slika 3.) na čijem se kraju nalazi jaki anion poput klorida ili bromida [24]. Iako je moguće koristiti i jodidni anion na kraju ugljikovodičnih lanaca, njegova primjena u kvaternim amonijeve solima je rijetka jer smanjuje topljivost ovih spojeva. Jedna od četiri alkilne

skupine vezane na dušik obično sadrži više od osam ugljikovih atoma i djeluje kao hidrofobni dio spoja. Jednostavne kvaterne amonijeve soli su stabilne i dobro topljive u vodi, dok vrsta aniona može značajno utjecati na promjenu njihove topljivosti. Zbog svojih surfaktantskih karakteristika, KAS posjeduju sposobnost stvaranja micela te su često izložene testovima kritične koncentracije micela (engl. *critical micelle concentration, CMC*). Ova testiranja osiguravaju unapređenje antimikrobne i surfaktantske aktivnosti kvaternih amonijevih soli te vode do razvoja učinkovitijih i industrijski povoljnijih kemijskih formula. Dokazano je da je antimikrobno djelovanje kvaternih amonijevih soli izravno ovisi o snazi njihovih hidrofobnih skupina, pri čemu snažnije hidrofobne skupine značajno povećavaju njihovu učinkovitost. [23,24].



*Slika 3. Osnovna struktura KAS [23]*

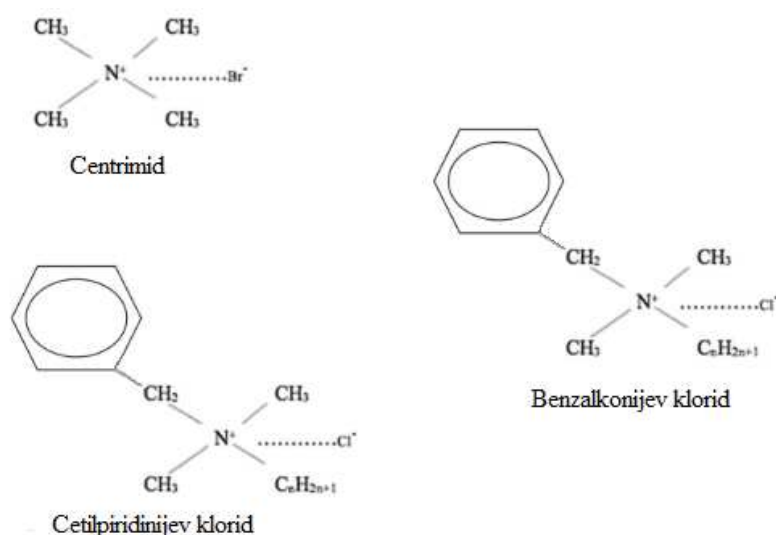
Primarna uporaba KAS je u obliku tekućih dezinficijensa. Osim tekuće aplikacije, KAS mogu kemijski biti povezane s tekstilnim strukturama, što može utjecati na njihovu kemijsku aktivnost ovisno o načinu povezivanja i trenutnoj strukturi implementiranoj u tekstilni materijal. Kada su kemijski povezane na tekstilnu površinu, antimikrobno djelovanje očituje se postupnim otpuštanjem s te površine. Ova metoda učinkovita je u borbi protiv mikroorganizama, ali može utjecati na kvalitetu i trajnost materijala, što uvelike utječe na proizvođače i ekonomiju [24]. Od sedamdesetih godina prošlog stoljeća pa sve do sada, šira istraživanja KAS-a doprinijela su širokoj industrijskoj komercijalizaciji vodeći do mnogobrojnih efektivnih KAS od kojih se najviše ističe „Dow Corning 5700“ koji koristi siloksilne grupe kao poveznicu između vlastite strukture i strukture celuloznih površina, a njegova primarna uporaba je kao završni antimikrobni sloj na zaštitnoj odjeći [24].

#### 2.4. Dezinficijensi na bazi kvaternih amonijevih soli

Dezinficijensi ili biocidi kemijski su agensi čija je funkcija uklanjanje i sprječavanje razmnožavanja patogena koji se mogu nalaziti i širiti se kroz okolinu u prostorima zdravstvenih ustanova, prostorima za obradu hrane te u vlastitim domovima [25]. Implementacija KAS kao i njihov strukturni oblik u biocidima utječe na djelotvornost protiv specifičnih organizama, a time i potencijalno na razvijanje rezistentnosti prema određenom biocidu. Pojava kvaternog dušika prirodna je pojava u velikom broju organizama koji služi pri raznim biokemijskim procesima. Prvobitna sinteza i identifikacija antimikrobnih aktivnosti KAS dogodila se prije manje od sto godina, a sve do Drugog Svjetskog rata, njihova uporaba nije bila od većeg značenja [26]. Današnji razvitak znanosti i razvoja kemije omogućili su njihovo korištenje u industriji hrane te proizvoda za čišćenje i dezinfekciju u zdravstvu, a njihova niska toksičnost i mogućnosti formulacije za određene svrhe samo povećavaju njihove sposobnosti i mogućnosti za daljnje aplikacije [25,26].

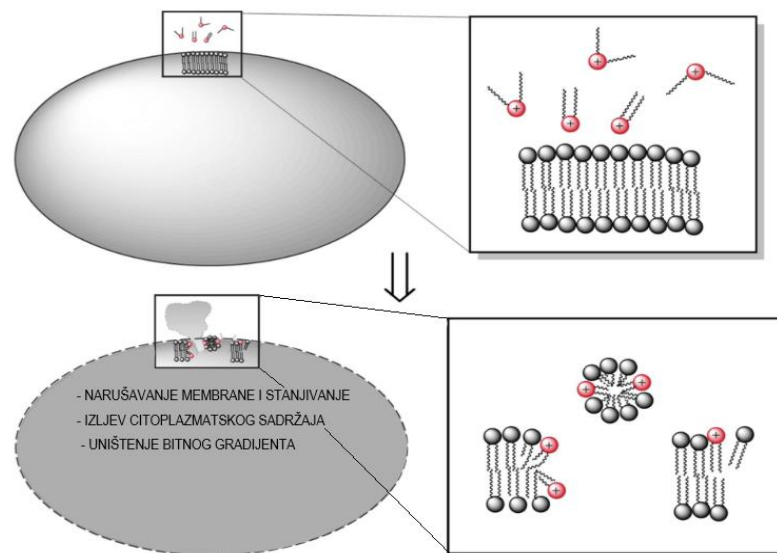
KAS koje se pojavljuju u modernim biocidima (Slika 4.) sortirane su ovisno o broju dušikovih atoma, prirodi ugljikovodičnih lanaca te potencijalnom postojanju aromatskih skupina dok svaka od navedenih kategorija varijabilno rezultira promjenjivom antimikrobnom djelotvornošću te dozom koja je potrebna da eliminira željeni mikroorganizam. Integracija relativno dugih metilnih skupina ( $C_{12}$ - $C_{16}$ ) u strukturu KAS rezultira poboljšanom antimikrobnom aktivnošću [27]. Biocidna aktivnost KAS izravno ovisi o njihovoj koncentraciji u kemijskom pripravku. Dosljedno, pri koncentracijama od 0,5 do 5 mg/l KAS se ponašaju kao algistatici, bakteriostatici, tuberkulostatici, sporostatici te fungistatici dok se pri koncentracijama od 10 do 50 mg/L ponašaju mikrobicidno za sve skupine ovisno o industrijskoj formulaciji kemijskog pripravka [28].





**Slika 4.** Poznati KAS-ovi korišteni kao biocidi [25]

Djelovanje KAS na mikroorganizme može se opisati slično kao djelovanje detergenata. Naime, KAS djeluju kao aktivni agensi čije je djelovanje usmjereno prema membranama stupajući u interakciju s citoplazmatskom membranom bakterija i plazmatskom membranom kvasaca. Nakon probijanja membrana, KAS aktivno sudjeluju u uništavanju unutarstaničnih ciljeva te se vežu s DNA domaćina [28]. Mehanizam djelovanja KAS na mikroorganizme započinje elektrostatskim interakcijama među pozitivno nabijenim glavama KAS te negativno nabijene bakterijske stanične membrane (Slika 5.) uslijed čega dolazi do umetanja bočnih lanaca KAS u intramembranski prostor uz stvaranje micela. Nastala puknuća na staničnoj membrani bakterije uzrokuju reorganizaciju stanične membrane što dovodi do curenja citoplazmatskog sadržaja te u konačnici i do smrti stanice. Uočeno je da KAS učinkovitije djeluju na Gram-pozitivne bakterije koje posjeduju jedan fosfolipidni sloj i debeli sloj peptidoglikana u njihovoj staničnoj membrani, dok Gram-negativne bakterije imaju dva fosfolipidna sloja i tanji sloj peptidoglikana. Zbog prisutnosti dodatne membrane u strukturi stanične stijenke Gram-negativnih bakterija, KAS, kao i drugi kemijski agensi koji ciljaju membrane, pokazuju smanjenu učinkovitost pri eliminaciji tih mikroorganizama. [25,28].



*Slika 5. Ilustrirani prikaz mehanizma djelovanja KAS na bakteriju [25]*

## 2.5. Rezistentnost mikroorganizama

Pojam rezistentnosti opisan je kao relativna neosjetljivost mikroorganizma na određeni tretman koji uključuje specifične i definirane uvjete. Za antimikrobnih agenasa, rezistentnost se obično kvantitativno određuje pomoću minimalne koncentracije potrebne za postizanje nekog određenog učinka (npr. inhibicije rasta) na populaciju stanica [29]. Rezistentnost je, kao genetički predodređenu pojavu, potrebno razlikovati od fenotipskih procesa prilagodbe, koji nisu naslijeđeni, prenosivi ili održavani nakon uklanjanja specifičnih uvjeta. Smanjenje rezistentnosti, kao i adaptacije na biocide moguće je ostvariti temeljitim čišćenjem i dezinfekcijom uz korištenje koncentracija biocida iznad mikrobicidne koncentracije [32].

Rezistentnost bakterija na biocide podijeljena je na urođenu i stečenu. Urođena rezistentnost podrazumijeva prirodno smanjenu osjetljivost na specifični kemijski agent, a ovakav tip rezistentnosti javlja se često kod Gram-negativnih bakterija. Nasuprot urođenoj, stečena rezistentnost nastaje mutacijom specifičnih gena unutar bakterijske jedinice ili stjecanjem starih gena koji su zaslužni za preživljavanje u teškim uvjetima [30]. Usprkos rezistentnosti koja može uslijediti mutacijom određenih postojećih gena, smatra se da rezistentnost na antimikrobne agense najvećim dijelom razvija stjecanjem gena za antimikrobnu otpornost [34].

Nespecifično djelovanje i priroda ciljanja više komponenata unutar jednog mikroorganizma omogućava KAS da uništi organizam usprkos eventualne mutacije jedne od

komponenti ciljanog organizma [25]. Djelotvornost biocida temelji se na pojmu minimalne koncentracije za inhibiciju rasta (engl. *Minimal Inhibitory Concentration, MIC*) koji označava mjeru osjetljivosti mikroorganizma na upotrebljavani kemijski agens [29]. Ispitivanjima utvrđeno je da su KAS pokazale znatno manje MIC vrijednosti u odnosu na antibiotike [30]. Pretpostavljeno je da se dugotrajnom uporabom KAS, prag tolerancije bakterija može povećati [25]. Nasuprot tome, nespecifičnim djelovanjem KAS na mikroorganizme, vjerojatnost razvitka totalne rezistentnosti na KAS iznimno je niska što je potvrđeno višestrukim znanstvenim radovima [30-33].

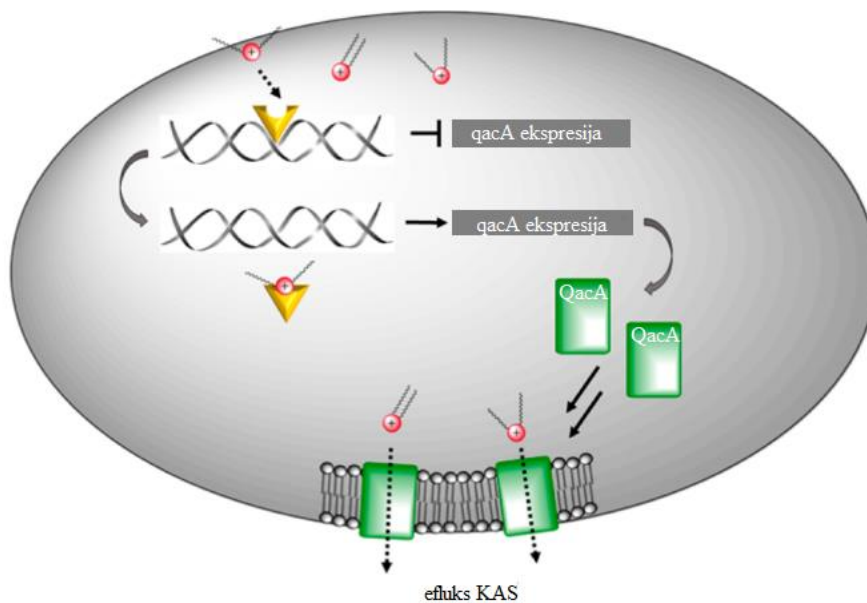
Izolacijom bakterija i proučavanjem njihovih plazmida, uspješno je izoliran i imenovan manji broj gena zaslužnih za otpornost na kvaterne amonijeve soli. Identificirani geni imaju zadaću kodiranja proteina koji su zaduženi za eliminaciju hidrofobnih antimikrobnih agensa i ostalih kationskih dezinficijenasa. Osim rezistentnosti uzrokovane promjenom gena, bakterije koriste mehanizam efluksa, odnosno mehanizam kojim aktivni transporteri izbacuju neželjene supstance (u ovom slučaju biocide) van stanice. Efluksne pumpe bazirane su na specifičnosti za pojedini supstrat ili za širok spektar supstrata. Primjer pumpa za širok spektar supstrata su pumpe za otpornost na više lijekova koje bivaju regulirane proteinima za otpornost na više lijekova (engl. *multidrug resistance proteins, MDR*) čija je glavna zadaća izbacivanje raznih toksičnih agensa, antibiotika te KAS. Ove pumpe, ovisne o energiji, imaju sposobnost izbacivanja antimikrobnih spojeva bez mijenjanja njegove kemijske strukture [30].

Genska otpornost na KAS određena je genima *qacA* i *qacB* koji su lokalizirani na velikim plazmidima te genima *smr*, *qacG*, *qacH* te *qacJ* koji su lokalizirani na plazmidima manjim od 3kb. Geni koje pronalazimo na manjim plazmidima uglavnom su smješteni u genskim kasetama te su zaduženi za kodiranje proteina koji su članovi proteinske grupacije sa smanjenom otpornosti na više lijekova (engl. *small multidrug resistance family, SMR*) [34]. Nasuprot njima, geni *qacA* i *qacB* kodiraju specifične proteine u superobitelji membranskih transportnih (engl. *major facilitator superfamily, MFS*) proteina koji su zaduženi za olakšana kretanja malih otopljenih tvari kroz staničnu membranu kao odgovor na određeni kremiosmotski gradijent [35]. Cjelokupni niz proteina koji su kodirani genima za otpornost nalaze se uklopljeni u staničnu membranu [36].

Zbog bliske povezanosti, ali velikog kontrasta između dva gena, geni *qacA* i *qacB* teško bivaju točno raspoznati pri genskim testiranjima. Nastavno, *qacA* upotrebljava kodiranje za sintezu transmembranske efluks pumpe *QacA* koja se sastoji od 14 spiralnih zavojnica. *QacA* koristi nabijeni oblik asparaginske kiseline (D323) te pokretačku silu protona (slika 6.) za

identifikaciju te odstranjivanje mono- i bis- kvaternih amonijevih soli iz stanice [25,36,37]. Vrlo mala od 7 nukleotida između dva gena, omogućava genu *qacB* veći stupanj specifičnosti prema mono-kvaternim amonijevim solima zbog nenabijenog alanina koji je prisutan u strukturi. Ukoliko nastupi mutacija alanina u kiseli ostatak, efluksna pumpa koju kodira takav *qacB* posjedovat će značajnu sposobnost identifikacije dvovalentnih supstrata.

Sinteza efluksnih pumpi za KAS regulirana je pomoću proteina QacR koji djeluje kao negativni (inhibirajući) transkripcijski regulator [37] koji se veže unutar IR1 regije gena u obliku dimera kreirajući vezivnu šupljinu dovoljno veliku za supstrate KAS [38].



**Slika 6.** Prikaz mehanizma djelovanja *QacA* uz pokretačku silu protona pri djelovanju KAS na stanicu [23]

Ostvarivanjem jedne velike šupljine, omogućeno je i stvaranje dvije manje šupljine unutar vezivnog mjesta za KAS koje omogućuju vezanje šireg spektra strukturalno različitih supstrata. Vezivanje supstrata KAS na QacR uzrokuje konformacijske promjene uzrokujući njegovo odvajanje s DNA te transkripciju gena *qacA* rezultirajući sintezom QacA efluksnih pumpi, a time i izbacivanjem neželjenog, po stanicu toksičnog materijala. Izuzimanjem *qacR* iz genoma bakterije, stvaranje efluksnih pumpi potpuno je neselektivno i neučestalo [23,38,39].

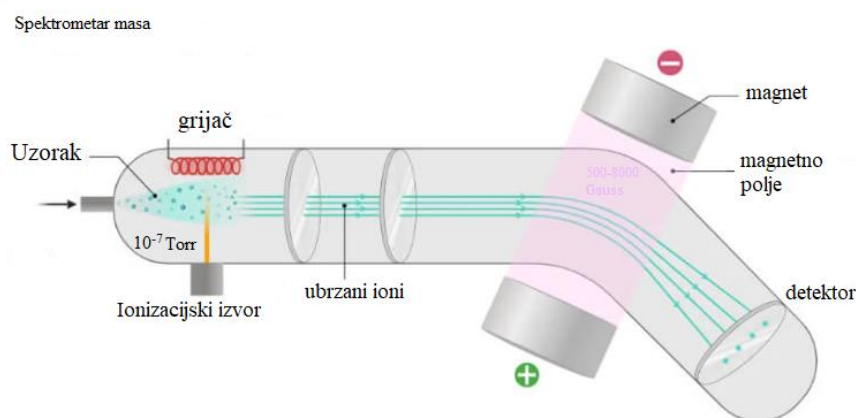
## 2.6. Masena spektrometrija

Zbog izuzetnih karakteristika kao što su nenadmašiva osjetljivost, visoke granice detekcije, brzina analize te raznolikost primjene, spektroskopija masa (engl. *mass spectrometry*, *MS*) smatra se jednom od najkorištenijih analitičkih metoda današnjeg doba. Modernim

razvitkom znanosti, uporaba MS primarno je usmjeravana na svakodnevne biokemijske probleme kao što su trovanja hranom kao i kontrola iste, forenzička istraživanja, razvijanje farmaceutskih proizvoda te otkrivanje proteoma određenih vrsta. Osim problema biokemijske prirode, MS se koristi pri istraživanjima atomske i reakcijske fizike, geokronologije, promatranja ion-molekulskih reakcija, promatranja anorganskih reakcija i dr. [40]

Spektrometrija masa je analitička tehnika kojom se kemijske tvari identificiraju razdvajanjem plinovitih iona u promjenjivom električnom i magnetnom polju prema njihovom omjeru mase i naboja ( $m/z$  omjer). Za analize primjenjuju se maseni spektroskopi (Slika 7.) koji se sastoje od 5 elementarnih dijelova [41] :

- Sustav vakuuma – omogućava prisustvo samo željenih iona u sustavu uređaja
- Sustav za uzorak – omogućava unos uzorka u uređaj i te njegovo prevođenje u plinovito stanje
- Ionizacijski izvor – omogućava ionizaciju uzorka; različit ovisno o stanju uzorka
- Analizator – djelovanje bazira na otklonu iona po njihovom omjeru mase i naboja koji prvotno prolaze kroz magnetno polje sve do detektora
- Detektor – prikupljanje informacija o razdvojenim ionima koje se prosljeđuju do uređaja za daljnju obradu podataka



**Slika 7.** Shematski prikaz spektrometra masa [8]

Sudar visokoenergetskog elektrona s molekulom učestalo dovodi do njene ionizacije koje rezultira izbacivanjem jednog od njezinih elektrona. Manjak elektrona rezultira stvaranje molekularnog iona (crvena oznaka; slika 8.). Preostala energija sudara može uzrokovati raspad molekularnog iona na neutralne fragmente (zelene oznake) i manje fragmentne ione (ružičasta i narančasta oznaka) koji se po svojoj prirodi, za razliku od molekularnog iona, mogu

pojavljivati kao radikalni kationi (ružičasta oznaka) ili kao karbokationi (narančasto označeno). Nakon razdvajanja, ioni prolaze kroz magnetno polje po principu otklanjanja sve do detektora gdje se dobiveni podatci obrađuju u procesu podataka [40, 41].



*Slika 8. Ionizacijsko razdvajanje molekula uzorka [41]*

## 2.7. Proteomika u analizi patogena hrane

Pojam proteomike predstavlja sveobuhvatno istraživanje svih eksprimiranih proteina ili cijelog proteoma u bilo kojem trenutku u organizmu. Proteom je skup svih proteina koji su eksprimirani u organizmu u nekom trenutku. Stoga proteomika nudi preciznu sliku onoga što se događa u određeno vrijeme u organizmu, uključujući koji su geni izraženi i koje modifikacije mogu imati rezultirajući proteini, ovisno o varijablama okoliša, a koristi se za otkrivanje biomarkera u kliničkoj dijagnozi, za proučavanje učinaka hranjivih tvari na ekspresiju ljudskih proteina, promjene u hrani pod određenim uvjetima ili za identifikaciju i validaciju bioaktivnih peptida hrane i njihovih učinaka na zdravlje. Uslijed sve češćih slučajeva trovanja hranom kontaminiranom različitim patogenima, velika se važnost pridaje istraživanjima njihovog djelovanja te potencijalne eliminacije, kako bi se proširilo znanje, a time i spriječilo daljnje trovanje hranom. Shodno tome, „OMIC“ tehnike koriste se za rapidno prepoznavanje određenih patogena. Upotreba ovakvih tehnika omogućila je pristup važnim podacima o biološkim i geografskim podrijetlima kao i informacijama o procesima proizvodnje hrane [42-45]. Ova skupina tehnika koristi se pri identifikaciji kolonija patogenih mikroorganizama u hrani i postrojenjima za obradu iste. Nadalje, ustanovljeno je da se primjena OMIC tehnika odražava u razvoju sigurnosti prehrambenih proizvoda kao i sprječavanja rizika bolesti koje se prenose kontaminiranom hranom.

Kroz višebrojna istraživanja u prehrambenoj industriji, mikrobiologiji te znanosti o kvaliteti hrane, sve veću pozornost privlači pojam „foodomics“ koji označava kompletan spektar OMIC analitičkih tehnika visoke djelotvornosti i razlučivosti koje se upotrebljavaju za istraživanje genoma, proteoma te metabolizma patogena prisutnih u hrani kao i detekciju patogena u industrijskim postrojenjima za obradu hrane [43]. OMIC metode obuhvaćaju niz

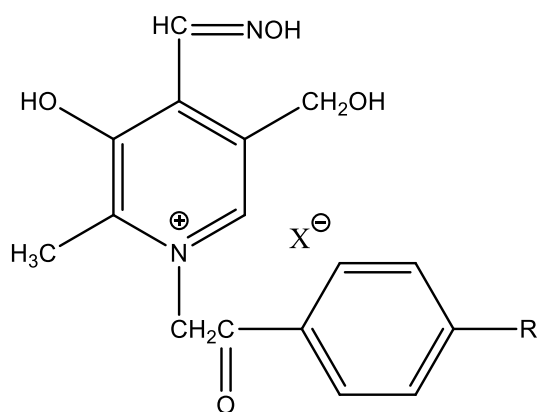
tehnika primjenjivanih u proteomici, transkriptomici, metabolici, kemometriji, biostatistici te bioinformatici koje zajedno omogućuju molekularne informacije o različitim nivoima ekspresije (geni, proteini, metaboliti...) [44]. Uz navedeno, foodomics tehnike korisne su pri poboljšanom razlikovanju patogena, otkrivanju zaraze sa specifičnim patogenom te identifikaciji patogena i njihovih toksina. Suprotno lakoj identifikaciji i pronalasku patogena u hrani nametnut je negativni aspekt iznimno visokog stupnja složenosti tehnika popraćen nedostatkom visoko obrazovanih pojedinaca za specifičnu granu unutar navedene skupine tehnika. Nadalje, navedene tehnike suočene su s problemom višestrukog broja lažnih pozitivnih rezultata koji nastaju kao posljedica širokog spektra metabolita, proteina, gena i dr [45].

Razvitkom proteomike ostvareni su mnogobrojni načini za provjerenu i pouzdanu kvantifikaciju proteina ili proteoma, a velik broj od razvijenih načina upotrebljava se u prehrambenoj industriji; pri kontroli kvalitete, očuvanju hrane i prehrambenoj bioaktivnosti. Uslijed razvitka analitičkih metoda kao što su tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography, LC*) i spektrometrija masa visoke osjetljivosti i rezolucije (engl. *high sensitivity and high-resolution tandem mass spectrometry*) omogućen je dublji uvid u istraživanju proteomike hrane i njezine sigurnosti [44,45]. Iako se koristi širok spektar metoda, stalne varijacije u komponentama ciljanog organizma zahtijevaju provođenje višestrukog broja analiza kako bi se dobile sveobuhvatne informacije o cijelom proteomu pojedinog patogena. Zbog analitičkih ograničenja, razvijene su i upotrebljavane moderne separacijske metode poput „top-down“ i „bottom-up“ modela, koje se kombiniraju sa spektrometrijom masa, gel elektroforezom ili tekućinskom kromatografijom. Na koncu analize i obradi podataka, navedeni proteini bivaju uspoređivani s odabranim bazama podataka kao što su GenBank, UniProt, UniRef i dr. [44]

### 3. Metode i materijali

#### 3.1. Inhibitori bakterijskog rasta

Kao inhibitori su u radu korištene četiri kvaterne amonijeve soli na bazi piridoksal oksima koje su sintetizirane i okarakterizirane u ranijim istraživanjima [51], a njihova je struktura prikazana na slici 9. Inhibitor 1 (1-(4'-fluorofenacil)-3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridinijev klorid) i Inhibitor 2 (3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metil-1-(4'-metoksifenacil) piridinijev klorid) su kloridne soli dobivene ionskom izmjenom iz odgovarajućih bromidnih soli, inhibitora 3 (1-(4'-fluorofenacil)-3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridinijev bromid) i inhibitora 4 (3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metil-1-(4'-methoksifenacil) piridinijev bromid).



- spoj 1 = R = -F; X = Cl  
spoj 2 = R = -OCH<sub>3</sub>; X = Cl  
spoj 3 = R = -F; X = Br  
spoj 4 = R = -OCH<sub>3</sub>; X = Br

**Slika 9.** Struktura korištenih kvaternih amonijevih soli na bazi piridoksla oksima

#### 3.2. Uzgoj bakterijske kulture i antibakterijska testiranja

Bakterijski soj *Yersinia enterocolitica* korišten u istraživanju, klinički je izoliran iz zaraženih pacijenata te identificiran pomoću API (engl. *Analytical Profile Indeks*) testa (API bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francuska). Izolirana bakterijska kultura održavana je na TGY (engl. *Tryptic Glucose Yeast*) agaru na 4 °C [46]. Prije provođenja eksperimenta, kulture su oživljene s dvije uzastopne, 24-satne inokulacije i inkubacije na 25 °C.



Utvrđivanje minimalnih baktericidnih (engl. *minimum bactericidal concentration*, MBC) i inhibitornih koncentracija (engl. *minimum inhibitory concentration*, MIC) ispitivanih spojeva provedeno je u tekućoj hranjivoj podlozi moždano srčani-bujon, BHI (engl. *Brain Heart Infusion broth*). Testirani oksimi otopljeni su u smjesi otapala koja je sadržavala 4 mL DMSO-a i 6 mL 10 % Tween 80 te su sterilizirani filtracijom (pore veličine 0,22  $\mu\text{m}$ ) [46,47]. Nakon filtracije, određivanje baktericidnih i inhibitornih koncentracija provedeno je metodom makro bujona (engl. *macro broth method*) [48,49]. Ispitivani spojevi su serijski razrijeđeni s 0,5 mL BHI tekuće podloge te inokulirani s 0,1 mL suspenzije *Y. enterocolitice*,  $1 \times 10^6$  CFU<sup>3</sup> (engl. *colony-forming unit*) mL<sup>-1</sup> [50] nakon čega je sadržaj epruveta inkubiran tijekom 24 sata na 25 °C. Nakon isteka vremena, bakterijski sadržaj je prebačen u epruvete s BHI bez inhibitora te je ponovno inkubiran tijekom 24 sata na 25 °C. Po završetku sekundarne inkubacije, u epruvetama gdje rast nije zabilježen, odgovarajuća koncentracija spoja bila je baktericidna, dok je minimalna inhibitorna koncentracija zabilježena od one koncentracije, prisutne u prvoj epruveti u kojoj je uočen rast bakterije. Antibakterijska istraživanja ponavljana su tri puta za pojedinačni inhibitor [46].

### 3.3. Izolacija proteina

Bakterijske stanice su lizirane mehaničkim putem u disruptoru stanica Mini-Beadbeater-1 (Biospec Products, Beatlesville, OK, USA) pomoću kuglica (promjera 0,1 mm).

Epruvete s bakterijskim homogenatom centrifugirane su pri 5000 x g tijekom 20 minuta. Dobiveni precipitati resuspendirani su u ekstrakcijskom puferu i podvrgnuti ekstrakciji u slijedu prema hidrofobnosti proteina koristeći ReadyPrep komplet za ekstrakciju (BioRad, Hercules, CA, USA) [47,51]. ReadyPrep komplet sadrži tri ekstrakcijske otopine koje se međusobno razlikuju u koncentraciji deterdženata i kaotropskih (tvari koje destrukturiraju vodu) agenasa, što rezultira otopinama s rastućim sposobnostima solubilizacije: otopina 1 (40 mM Tris baze) ekstrahira samo najtopivije citosolne proteine; otopina 2 (8 M urea, 4 % (w/v) CHAPS „zwitterionski“ deterdžent, 40 mM Tris, 0.2% (w/v) Bio-Lyte 3/10 amfolit i 2 mM reducirajuće sredstvo tributil-fosfat (TBP)) ekstrahira proteine srednje topljivosti i otopina 3 (5 M urea, 2 M tiourea, 2 % (w/v) CHAPS, 2 % (w/v) SB 3–10, 40 mM Tris, 0.2% (w/v) BioLyte 3/10 amfolit i 2 mM TBP) ekstrahira preostale proteine koji se ne otapaju u otopini 1 i 2. Cjelokupna ekstrakcija je provedena u jednoj mikroepreveti kako bi se minimalizirali gubici proteina.

---

<sup>3</sup> Jedinica koja predstavlja približni broj održivih mikroorganizama (bakterija, gljivica, virusa, itd.) u uzorku

Postupak ekstrakcije u slijedu započet je dodavanjem 500  $\mu\text{L}$  otopine 1 bakterijskom homogenatu dobivenom nakon liziranja stanica nakon čega slijedi kratka sonifikacija. Suspenzija je potom centrifugirana 10 min na 4  $^{\circ}\text{C}$  i 12 000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Germany). Supernatant je odvojen u novu mikroeprivetu, a talog je ponovno resuspendiran u 250  $\mu\text{L}$  otopine 1 te je postupak ponovljen još jednom. Svi supernatanti su spojeni u jednu mikroeprivetu. Potom je talogu dodano 250  $\mu\text{L}$  otopine 2 te je ekstrakcija provedena kao i za otopinu 1. Talogu, preostalom nakon ekstrakcije s otopinom 2, dodano je 250  $\mu\text{L}$  otopine 3 i ekstrakcija je provedena kako je prethodno opisano.

Ekstraktima je određena koncentracija ukupnih proteina metodom s bikinoničnom kiselinom (BCA) koristeći BCA komplet za kvantifikaciju proteina (Pierce, Rockford, IL, USA). Količina proteina uzeta za provedbu elektroforeze tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa s ionizacijom elektroraspršenjem, LC-ESI-MS (engl. *Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*) bila je  $\sim 20 \mu\text{g/mL}$ .

#### 3.4. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima

Uzorcima s  $\sim 20 \mu\text{g/mL}$  proteina dodan je pufer za nanošenje uzoraka (NuPAGE LDS sastava: 40 % glicerol, 4 % litijev dodecil-sulfat; 4 % Ficoll<sup>TM</sup> 400; 0,8 M trietanolamin-klorid s pH 7,6; 0,025 % boje Coomassie G250, 2 mM otopina dinatrijeve etilendiamintetraoctene kiseline (Na-EDTA); Termo Fischer Scientific) u omjeru 1 : 4 te su zagrijavani na 100  $^{\circ}\text{C}$  5 min. Pufer je sadržavao sredstvo za redukciju (ditiotreitrol, DTT) i denaturaciju proteina (litijev dodecil-sulfat, LDS). Potom su uzorci nanešeni u jažici gela (4 – 12 % Bis-Tris NuPAGE, Termo Fischer Scientific). Elektroforeza je provedena pomoću sustava XCell Surelock Mini-Cell (Invitrogen, Carlsbad, SAD) pri 200 V konstantnog napona u trajanju od 45 min.

#### 3.5. Digestija uzoraka u gelu

Nakon razdvajanja proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu, dobivene proteinske vrpce, izrezane su na sitne kockice i podvrgnute postupku digestije u gelu (eng. „*in-gel*“ *digestion*) [53]. Komadići gela su prvo isprani vodom visokog stupnja čistoće, a potom sa smjesom 1:1 (v/v) 0,1 M amonijeva bikarbonata ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) i acetonitrila u trajanju od 15 min uz potresanje. Tekućina je uklonjena, a komadićima gela je dodan acetonitril te su ostavljeni sve dok se nisu potpuno slijepili i skupili. Acetonitril je tada uklonjen, a dodatkom 0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  provedena je rehidratacija u trajanju od 10 min. Acetonitril je ponovno dodan u

količini jednakoj prethodno dodanom 0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  kako bi se postigao omjer 1:1 v/v. Nakon inkubacije 10 min, uklonjena je sva tekućina te su komadići gela osušeni u vakuum centrifugi.

Dodatkom 10 mM DTT u 0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  provedena je redukcija proteina u trajanju od 45 min na 56 °C, a potom je provedena alkilacija s 55 mM jodoacetamidom u 0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 30 min na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon redukcije i alkiliranja, komadići gela isprani su ponavljanjem ranije opisanog postupka. Poslije ispiranja, proteini u komadićima gela su podvrgnuti razgradnji djelovanjem proteolitičkog enzima tripsina (Sigma). Svakom je uzorku dodano 30  $\mu\text{L}$  otopine tripsina koncentracije 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  te su 24 sata ostavljeni na 37 °C. Peptidi zaostali u gelu su izdvojeni dodatkom 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  kojemu je nakon inkubacije od 10 min dodana jednaka količina acetonitrila. Postupak je ponovljen dva puta s 5 %-tnom mravljom kiselinom i acetonitriplom. Svi su ekstrakti spojeni s tripsinskim ekstraktom i osušeni u vakuum centrifugi.

### 3.6. Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

Nakon digestije tripsinom, dobiveni su peptidi razdvojeni i identificirani tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa s ionizacijom elektroraspršenjem, LC-ESI-MS/MS (engl. *liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*). Za tekućinsku kromatografiju korišten je reverzno-fazni stupac C-18 (C-18 PepMap 100, LC Packings/Dionex). Peptidi su eluirani pomoću linearnog gradijenta s početnim 100 %-tnim otapalom A (0,1 M octena kiselina u vodi) i završavao s 70 %-tnim otapalom B (0,1 M octena kiselina u acetonitriplu) u trajanju od 60 min. Eluirani peptidi direktno su ubrizgani u LTQ Velos Orbitrap maseni spektrometar (Thermo Electron Corp, SAD). Uparivanje peptidnih spektara provedeno je pomoću baze podataka NCBI (preuzeto s NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html)) koristeći Mascot v.2.3. (Matrix Science, SAD). Identifikacije proteina su izvedene iz podudarnosti peptida korištenjem ProteoIQ v.2.3.08 [55]. Kvantifikacija bez oznake proteina (LFQ) provedeno je spektralnim brojanjem identificiranih MS/MS spektara korištenjem ProteoIQ softver.

### 3.7. Ontologija gena

Za analizu identificiranih proteina prema njihovim genskim ontologijama, korišten je internetski alat QuickGO [56]. Svaki protein ima UniProt pristupni kod, a pomoću QuickGO-a različite genske anotacije, unesene ručno ili elektronski u grupe za anotaciju „GO Consortium“, povezuju se s odgovarajućim UniProt pristupnim kodom. QuickGO-om omogućeno je dodjeljivanje anotacija proteinima prema njihovim biološkim procesima, molekularnim funkcijama te staničnim komponentama. Postojanje više genskih anotacija za pojedini protein je moguće te su svi navedeni podatci prikazani u rezultatima pretraživanja [47,50].

## 4. Rezultati i rasprava

### 4.1. Inhibitorno djelovanje kvaternih amonijevih soli

U ovom istraživanju, kao inhibitori, odabrane su kvaterne amonijeve soli, koje su prethodno sintetizirane i prevedene iz bromida u kloride prema Gašo i sur. [51], koristeći zajednički početni spoj, piridoksal oksim. Po kemijskoj prirodi, KAS su kemijski spojevi sastavljeni od pozitivno nabijenog dušika povezanog s četiri alkilne ili arilne skupine, uz prisutnost jakog aniona, poput klorida ili bromida. Zbog vlastite kemijske stabilnosti, dobre topljivosti u vodi te surfaktantskih svojstava, koja im omogućuju stvaranje micela, KAS pokazuju visoku baktericidnu učinkovitost. Uglavnom se koriste u dezinficijensima, a njihova baktericidna učinkovitost ovisi o broju prisutnih dušikovih atoma te duljini metilnih skupina [23-26].

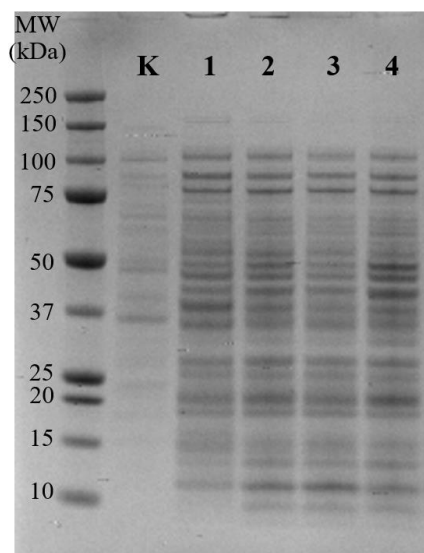
Odabranim kvaternim amonijevim solima (inhibitori 1-4) ispitano je inhibitorno djelovanje na rast bakterije *Y. enterocolitica*. U tablici 3. prikazane su vrijednosti MBC i MIC. Vrijednosti za MIC kretale su se u rasponu od 250 do 1000 ppm dok su vrijednosti za MBC bile od 500 do 1000 ppm. Najslabije inhibitorno djelovanje pokazao je inhibitor 4.

**Tablica 3.** Minimalne baktericidne (MBC) i minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

	1		2		3		4	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1000	500	500	250	500	250	>1000	1000

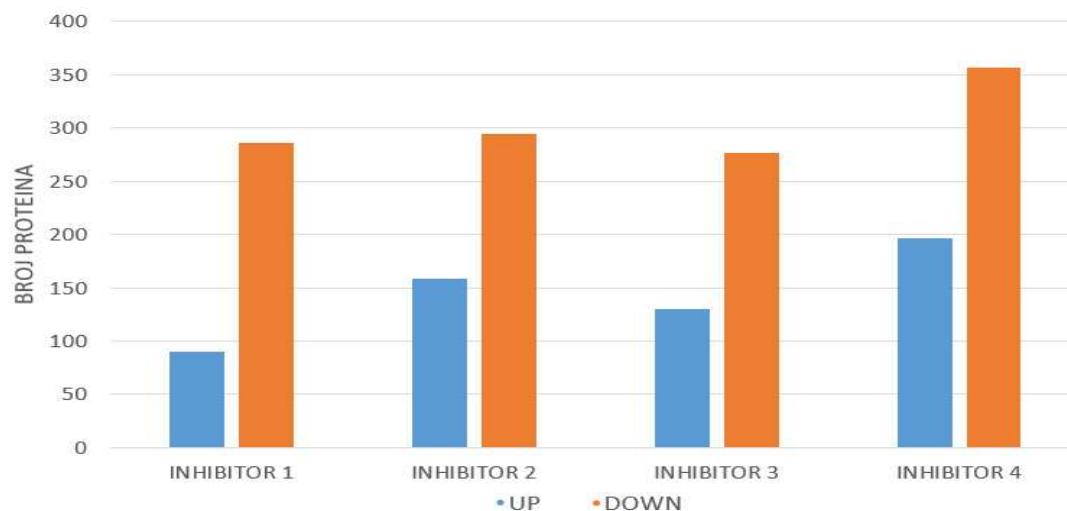
### 4.2. Identifikacija proteina i određivanje razlika u ekspresiji

Nakon inhibicije, ekstrakti proteina iz staničnih lizata *Y. enterocolitica* razdvojeni su pomoću elektroforeze u poliakrilamidnom gelu pri denaturirajućim uvjetima. Slika dobivenog gela prikazana je na slici 10. Trake gela s razdvojenim proteinima podvrgnute su digestiji u gelu te su dalje analizirani i identificirani pomoću LC-ESI-MS.

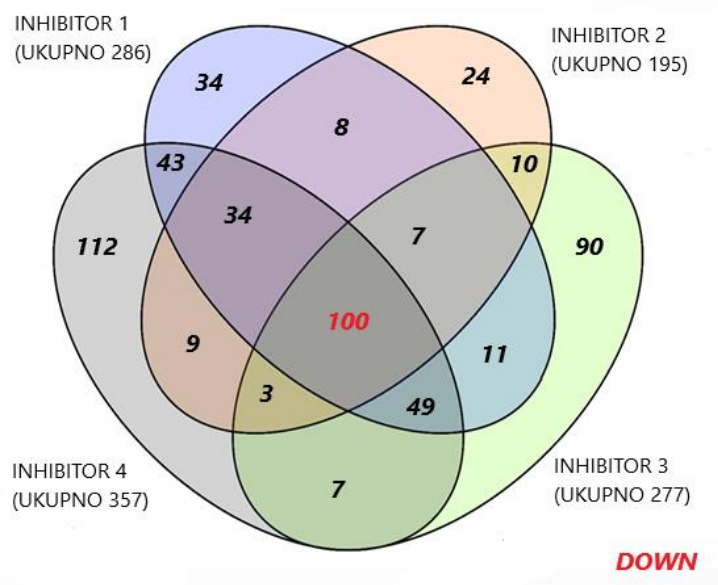


**Slika 10.** Proteini razdvojeni elektroforezom u poliakrilamidnom gelu pri denaturirajućim uvjetima. K - netretirana *Y. enterocolitica*, 1- inhibicija inhibitorom 1, 2- inhibicija inhibitorom 2, 3- inhibicija inhibitorom 3, 4- inhibicija inhibitorom 4

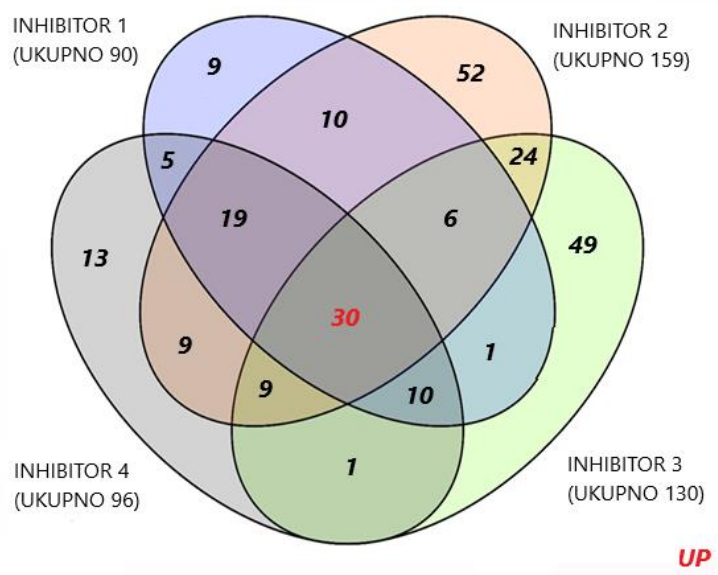
Nakon provođenja dodatnih testiranja i analiza, uključujući SDS-PAGE i LC-ESI-MS/MS, podatci su obrađeni koristeći programe Mascot v.2..3. i ProteoIQ. Podatci su zatim adekvatno sortirani i uspoređeni pomoću UniProt alata kako bi bili spremni za daljnju obradu. Zajednički broj proteina identificiran u svim uzorcima *Y. enterocolitica* u kojima je ekspresija povećana tretiranjem s KAS iznosi 575, dok je identificirani broj proteina sa smanjenom ekspresijom 1215. Ukupne brojke eksprimiranih „down“ proteina prevladavaju „up“ proteine u omjeru 2:1 (Slika 11.). Velik skup podataka sažeto je prikazan slikama 12. i 13., koje prikazuju preklapanje određenih „down“, odnosno „up“ proteina eksprimiranih u prisutnosti odgovarajućeg inhibitora.



**Slika 11.** Analiza odnosa eksprimiranih UP i DOWN proteina



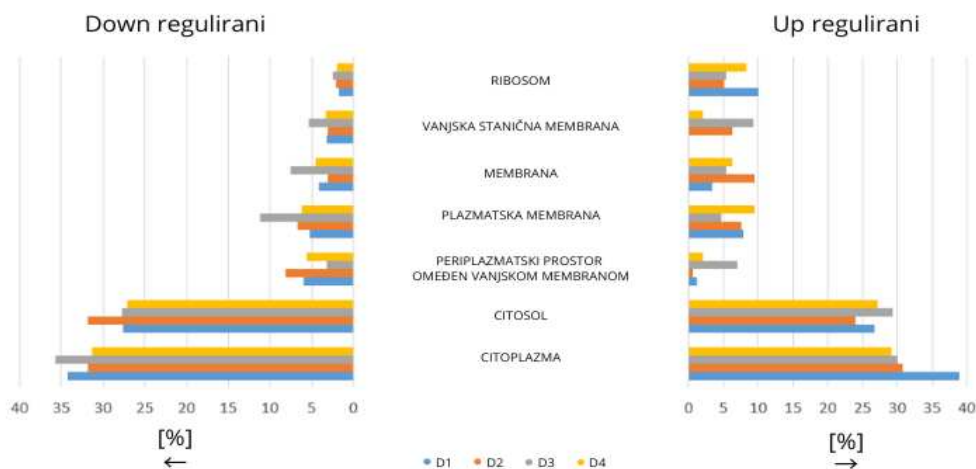
**Slika 12.** Vennov dijagram preklapanja DOWN reguliranih proteina uz prisustvo inhibitora (inhibitor 1 - inhibitor4)



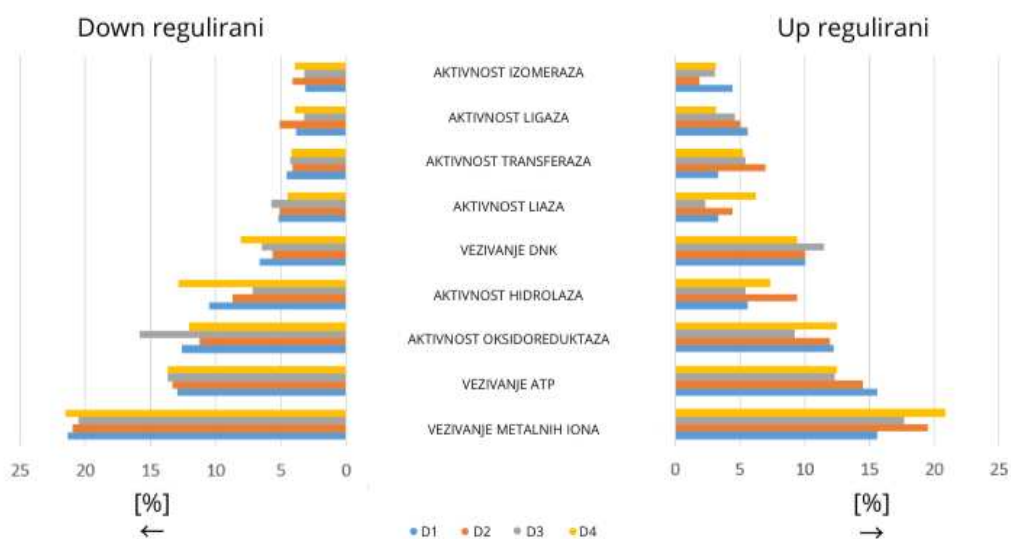
**Slika 13.** Vennov dijagram preklapanja UP reguliranih proteina uz prisustvo inhibitora (inhibitor 1 – inhibitor 4)

### 4.3. Genska ontologija

Proteini sa značajnim LQF vrijednostima su sortirani i odabrani nakon čega je provedena genska ontologija. Korištenjem internetskog alata QuickGO, proteini su klasificirani prema njihovim genskim anotacijama. Analiza pomoću QuickGO-a imala je za cilj identificirati promjene u strukturi i funkciji *Y. enterocolitica* uzrokovane tretmanom kvaternim amonijevim solima. Slike 14., 15. i 16. prikazuju postotak proteina od ukupnog broja proteina s „down“ ili „up“ ekspresijom nakon tretmana kvaternim amonijevim solima, razvrstanih prema njihovim staničnim lokalizacijama, molekularnim funkcijama te biološkim procesima.

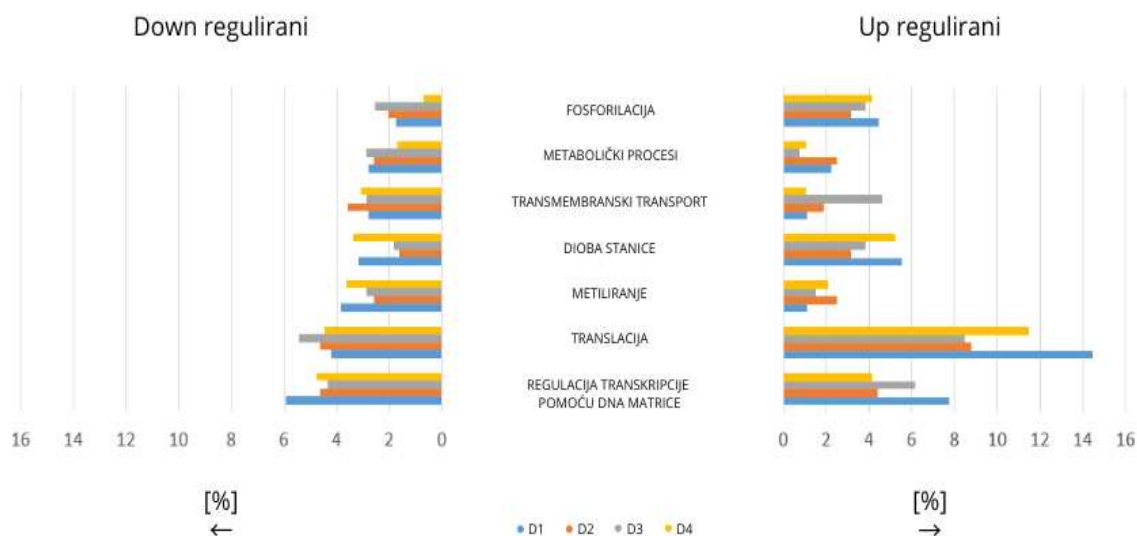


**Slika 14.** Analiza staničnih lokalizacija DOWN i UP reguliranih proteina



**Slika 15.** Analiza molekularnih funkcija DOWN i UP reguliranih proteina





**Slika 16.** Analiza bioloških procesa DOWN i UP proteina

Na temelju stanične lokalizacije prikazane na slici 14., većina proteina sa smanjenom ekspresijom („down“) lokalizirana je unutar stanice (intrastanično), konkretno u citoplazmi i citosolu. Manji broj ovih proteina smješten je u membrani, vanjskoj staničnoj i periplazmatskoj membrani te prostoru kojeg ona okružuje. Najmanji broj „down“ proteina otkriven je u ribosomima. Suprotno staničnim anotacijama „down“ proteina, kod „up“ proteina najmanji broj proteina nalazi se u periplazmatskom prostoru omeđenom vanjskom membranom. Manji broj „up“ proteina prisutan je u ribosomima i membranama, dok je njihova ekspresija u citosolu i citoplazmi približno jednaka. Može se uočiti da je najizraženija razlika između „up“ i „down“ reguliranih proteinima u proteinima prisutnim u ribosomima, pri čemu je kod „down“ reguliranih došlo do smanjenja ekspresije.

Analizom genskih anotacija molekularnih funkcija iz slike 15., uočena je slična ekspresija u obje regulacije proteina. Pregledom podataka, primijećena je povećana zajednička ekspresija proteina koji su uključeni u aktivnost oksidoreduktaza, kao i u vezivanje ATP-a i metalnih iona. Daljnja analiza otkriva da su ekspresije reguliranih proteina uključenih u aktivnosti izomeraza, ligaza, liaza i transferaza približno uravnotežene. S obzirom na ekspresiju proteina zaslužnih za aktivnost hidrolaza, zapaženo je da je njihova ekspresija približno dvostruko veća kod „down“ proteina u usporedbi s „up“ proteinima. S druge strane, proteini odgovorni za vezivanje DNK pokazuju približno dvostruko veću ekspresiju kod „up“ proteina nego kod „down“ proteina.

Slika 16. prikazuje razine ekspresije „down“ i „up“ proteina u odnosu na genske anotacije bioloških procesa. Vidljivo je da je ekspresija „down“ proteina povezanih s biološkim procesima u većini promatranih anotacija izraženija. Najveća razlika uočava se kod „up“ proteina u usporedbi s „down“ proteinima koji sudjeluju u procesu translacije. U postotcima eksprimiranih proteina uključenih u procese fosforilacije, metiliranja, diobe stanice, transmembranskog transporta te metaboličkih procesa „down“ proteina nema većih razlika.,

#### 4.4. Analiza različito eksprimiranih proteina

Identifikacija zajedničkih preklapanja i ekspresije određenih proteina pruža uvid u njihovu važnost za pravilno funkcioniranje i preživljavanje ciljanog patogena. Među proteinima koji su pokazali smanjenu ekspresiju nakon tretiranja sa sva četiri inhibitora odabrano je nekoliko proteina (Tablica 4.) koji imaju važnu ulogu u normalnoj funkciji i rastu bakterije *Y. enterocolitica*.

**Tablica 4.** Lista UP reguliranih proteina koji se pojavljuju s povećanim vrijednostima u svim uzorcima nakon tretiranja s četiri različita inhibitora

GEN	IME PROTEINA	UNIPROT	LQF VRIJEDNOSTI			
			INHIBITOR 1	INHIBITOR 2	INHIBITOR 3	INHIBITOR 4
nusB	Transkripcijski antiterminacijski protein NusB	A0A0E1NG64	-6,794	-3,563	-3,603	-6,891
manZ_1	PTS podjedinica transportera manoze IID	A0A0E1NE70	-3,019	-5,763	-3,492	-3,318
sucD	Sukcinat-CoA ligaza alfa podjedinica	A0A0E1N9W7	-6,604	-6,894	-7,821	-6,211
fabG_4	Pretpostavljena kratkolančana dehidrogenaza	A0A0H5GUM6	-3,244	-3,106	-2,863	-5,931
yggX	Fe(2+) prijenosni protein	F2Q870	-3,273	-3,155	-2,833	-5,673
sodB	Superoksid dismutaza	A0A0E1NA28	-5,559	-3,102	-2,15	-5,412

Među njima je protein transkripcijski antiterminacijski protein NusB (A0A0E1NG64; engl. *Transcription antitermination protein NusB*) kojeg kodira gen *nusB*. Ovaj „down“ regulirani protein, sačinjen od 139 aminokiselina, ključan je za ispravno funkcioniranje regulacijskog mehanizma transkripcije. Fricke i sur. [54] su objavili da se ovaj protein nalazi u citosolu, a utvrđeno je da je njegova nazočnost povezana s biološkom funkcijom transkripcije ribosomske RNA. Uz *nusB*, značajnu ulogu ima i gen *manZ\_1* koji kodira protein PTS podjedinicu transportera manoze IID (A0A0E1NE70; engl. *PTS mannose transporter subunit IID*). Taj protein eksprimira se u plazmatskoj membrani te je ključan za ispravan rad fosfofenolpiruvat-ovisnog sustava fosfotransferaza za šećere, koji omogućuje bakteriji unos potrebnih šećera u stanicu. Najveća ekspresija *manZ\_1* uočena je nakon djelovanja inhibitora 2. Kao i u bakteriji *E. coli* prema Blattneru [57] pojava gena *sucD* u bakteriji *Y. enterocolitica*

ima vitalnu ulogu. Ovaj gen kodira enzim Sukcinil-CoA sintetazu (A0A0E1N9W7; engl. *Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha*) koja sudjeluje u ciklusu limunske kiseline koji spaja hidrolizu sukcinil-CoA sa sintezom ATP-a ili GTP-a što predstavlja jedini korak fosforilacije na razini supstrata unutar ciklusa limunske kiseline. Ovaj enzim sudjeluje u vezivanju nukleotida i katalitičkoj aktivnosti bakterije te posjeduje ključnu ulogu u funkcioniranju i sintezi kompleksa sukcinil-CoA ligaze. Gen *fabG\_4*, čija se najveća ekspresija očitovala u uzorku tretiranom inhibitorom 4, kodira kratkolančanu dehidrogenazu (A0A0H5GUM6; engl. *Putative short chain dehydrogenase*) te je povezan s oksido-redukcijskim aktivnostima 3-oksiacil-[acil prijenosni protein] (NADPH) reduktaze. Enzim kodiran genom *fabG\_4* ključan je i za ciklus sinteze masnih kiselina, u kojemu olakšava redukciju keto skupina u procesu elongacije acilnih lanaca [58]. Ovaj korak je neophodan za proizvodnju produljenih masnih kiselina koje su ključne komponente za održavanje i rast staničnih membrana bakterije. Ključan kao i prethodni geni i proteini, gen *yggX* kodira protein zadužen za prijenos  $Fe^{2+}$  iona (F2Q870; engl. *Fe<sup>2+</sup> trafficking protein*) koji je posrednik u prijenosu željeza između procesa njegovog prisvajanja ili procesa koji zahtijevaju željezo, poput sinteze i/ili popravka Fe-S klastera u biosintetskim enzimima. Nastavno, protein kodiran genom *yggX* igra važnu ulogu u staničnom odgovoru na oksidativni stres, a lokaliziran je u citosolu bakterije [59]. Superoksid dismutaza (A0A0E1NA28, engl. *Superoxide dismutase*), jedan od najizraženijih „down“ reguliranih proteina, kodirana genom *sodB*, ključna je u borbi protiv antioksidativnog stresa razgradnjom slobodnih superoksidnih anionskih radikala. Slično kao u istraživanju bakterije *Vibrio alginolyticus* prema Chen i sur. [60], identifikacija gena *sodB* ukazuje na povezanost s molekularnim funkcijama vezivanja metalnih iona i aktivnostima superoksid dismutaze, kao i s biološkim procesima detoksikacije.

Sukladno odabranim „down“ proteinima, analizirani su i „up“ regulirani proteini identificirani nakon tretmana sa sva četiri inhibitora, te su oni sa značajnijom razlikom u ekspresiji prikazani u tablici 5.

**Tablica 5.** Lista DOWN reguliranih proteina koji se pojavljuju s povećanim LQF vrijednostima u svim uzorcima nakon tretiranja s četiri različita inhibitora

GEN	IME PROTEINA	UNIPROT	LQF VRIJEDNOSTI			
			INHIBITOR 1	INHIBITOR 2	INHIBITOR 3	INHIBITOR 4
ORF	ORF protein	Q56881	8,026	8,026	8,026	8,026
yqiC	Prateći faktor biosinteze ubikinona UbiK	A0A0E1NDS2	6,978	7,353	4,841	7,454
rsuA	Pseudouridin sintaza	A0A0E1NL30	5,103	5,103	5,103	5,103
cspB	Protein hladnog šoka B	Q9F9R2	4,081	4,081	4,081	4,081
rplW	Protein velike ribosomske podjedinice ul23	POC2N0	3,739	2,148	3,595	3,829
minC	minC protein koji određuje mjesto septuma	A0A0H5H1R8	3,201	3,201	3,201	3,201

Protein ORF (Q56881; engl. *ORF protein*), koji je kodiran *ORF* genom, sastavni je dio GroEL-GroES kompleksa, smještenog u citosolu stanice, koji sudjeluje u preklapanju novo sintetiziranih ili stresom oštećenih proteina u staničnom okruženju. Sukladno tome, ORF gen omogućuje i vezivanje ATP-a, pojačava aktivnost izomeraze te igra ključnu ulogu u bakterijskom odgovoru na toplinu [61]. Ovaj protein jedan je od proteina s najvećom LQF vrijednosti dobivenom testiranjima. Uz ORF protein, značajnu ekspresiju sa svim inhibitorima, posjeduje protein pratećeg faktora biosinteze ubikinona (A0A0E1NDS2; engl. *Ubiquinone biosynthesis accessory factor UbiK*) kodiran genom *yiqC*. Spomenuti protein lokaliziran je u citoplazmi i citosolu. Značajnu ulogu ima njegova povezanost s biološkim procesom biosinteze ubikinona u kojoj je potreban da je sinteza ubikinona (koenzim Q) dovoljno učinkovita. Pored spomenutih proteina, važan „up“ protein koji se eksprimira kod *Y. enterocolitica* je protein pseudouridin sintaza (A0A0E1NL30; engl. *Pseudouridine synthase*). Ovaj protein, kodiran genom *rsuA*, odgovoran je za vezivanje RNA i aktivnosti rRNA pseudouridinske sintaze. Prema anotaciji bioloških procesa, pseudouridinska sintaza sudjeluje u enzimski usmjerenoj sintezi pseudouridinske rRNA, koja nakon modifikacije ovim enzimom postaje stabilnija i funkcionalnija unutar ribosoma. Među svim proteinima bakterije *Y. enterocolitica*, superoksid dismutaza i protein hladnog šoka B (Q9F9R2; engl. *cold shock protein B*) su među najvažnijim za preživljavanje ove bakterije. Gen *cspB* odgovoran je za kodiranje ovog proteina. Protein hladnog šoka B lokaliziran je u citosolu i citoplazmi, a povezan je s molekularnom funkcijom vezivanja nukleinskih kiselina i biološkim procesom regulacije. Ovaj protein zadužen je za prilagođavanje i preživljavanje u hladnim okruženjima, stabilizirajući RNA i proteine te regulirajući ostale gene za hladnoću [62]. Ovaj protein doprinosi preživljavanju bakterije pod stresom od hladnoće i može utjecati na njenu virulentnost. Ključan kao i prethodni geni i proteini, gen *rlpW* kodira protein uL23 velike ribosomske podjedinice (P0C2N0, engl. *Large ribosomal subunit protein uL23*) koji je uključen u procese sastavljanja velike ribosomske podjedinice i translacije [63]. Ovaj gen lokaliziran je u ribosomima, a dio je velike citosolne ribosomske podjedinice. Protein uL23 jedan je od prvih sastavljčkih proteina koji se veže s 23S rRNA. Također, uL23 se nalazi u blizini izlaznog tunela za polipeptide na ribosomu, gdje se stvara vezivno mjesto za ribosomski šaperon, koji pomaže u ispravnom savijanju novo sintetiziranih proteina. Za staničnu diobu i stvaranje septuma unutar diobe kod *Y. enterocolitica* analiziran je protein MinC (A0A0H5H1R8; engl. *Probable septum site-determining protein MinC*) koji vjerojatno određuje položaj septuma. Kodiran je genom *minC*, a povezan je s biološkim procesima morfogeneze stanice, regulacije stanične diobe i formiranja staničnog septuma te formaciji septuma pri diobi. Navedeni protein ponaša se kao inhibitor diobe stanice

koji blokira formiranje polarnih Z prstenova septuma (buduća mjesta podjele stanice) brzim oscilacijama između polova stanica poradi destabilizacije mladih formiranih FtsZ filamenata prije nego što postanu Z prstenovi. Bez eksprimiranja Minc proteina dolazi do nesimetrične diobe stanica.

## 5. Zaključak

Prikazane promjene u proteomu ukazuju na mehanizam djelovanja dezinficijensa na bazi kvaternih amonijevih soli protiv gram-negativne bakterije *Yersinia enterocolitica*. Najizraženije promjene vidljive su u smanjenju regulacije proteina ribosoma, kao i proteina koji su sastavni dio membrana, nakon tretiranja s odabranim KAS. Shodno tome, primijećena je smanjena ekspresija proteina koji sudjeluju u procesu translacije. Nakon tretmana, povećanje regulacije proteina najviše pokazalo u staničnim prostorima citosola i citoplazme. Promatrajući regulaciju proteina i njihove uloge u biološkim procesima, najveći postotak reguliranih proteina zadužen je za procese translacije te regulacije transkripcije, dok se najmanji broj proteina uključuje u metaboličke procese te transmembranski transport. Nakon tretmana kvaternim amonijevim solima, analizirano je nekoliko ključnih proteina bitnih za *Yersinia enterocolitica*, koji su bili odgovarajuće regulirani. Razmatranjem odabranih proteina omogućen je kratki uvid u rast, razvoj i preživljavanje bakterije. Korišteni inhibitori pokazali su više „down“ nego „up“ reguliranih proteina, što ukazuje na poremećaj esencijalnih staničnih procesa koji ometaju rast, razmnožavanje i preživljavanje bakterije. Analizirani rezultati doprinose istraživanju virulentnosti i patogenosti bakterija koje se prenose hranom, kao i njihovu preživljavanju u uvjetima stresa.

## 6. Popis literature

1. K. Yong, J. Choi, A. Cowie; Emerging point-of-care technologies for food safety analysis. *Sensors*, **2019**, *4*, 817–31.
2. H. Li, J. Zhu; Targeted metabolic profiling rapidly differentiates *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* at species and strain level., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2017**, *31*, 1669–1676.
3. R.A. Siciliano, S. Uzzau, M.F. Mazzeo; Proteomics for Studying Foodborne Microorganisms and Their Impact on Food Quality and Human Health., *Front. Nutr.* **2019**, *6*, 102-104.
4. P.B. Hutt; A history of government regulation of adulteration and misbranding of food. *Food Drug Cosm Law J.*, **1984**, *39*, 2–73.
5. S. Leckranee, M. Fawzi, N. Huda; A study on the potential of ants to act as vectors of foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, **2018**, *2*, 319-333.
6. A.K. Buhnia; *General Mechanism of Pathogenesis for Foodborne Pathogens* // Foodborne Microbial Pathogens / New York: Springer, **2008**, 93–112.
7. R.A.N. Chemielewski, J.F. Frank; Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comp. Rev. Food Sci*, **2003**, *2*, 22–32.
8. S.D. Conner , S.L. Schmid; Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, **2003**, *422*, 37–44.
9. A.A. Salyers, D.D. Whitt; *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*, Washington DC, ASM, **2002**, *2*, 57-73.
10. I. Chenyang, M. Jayaseelan, T. Christian, A.Thomas, R. Carolin; Isolate Specific Cold Response of *Yersinia enterocolitica* in Transcriptional, Proteomic, and Membrane Physiological Changes, *Front. microbiol.*, **2020**, *10*, 1-16
11. S. Joutsen, M. Fredriksson-Ahomaa; *Yersinia enterocolitica: Properties and Occurrence* // Encyclopedia of Food and Health, New York: Elsevier Ltd., **2016**, *2*, 606–611.
12. A. Rakin, D. Garzetti, H. Bouabe, L.D. Sprague; *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Med. Microbiol.*, **2015**, *11*, 1319–1344.
13. B.W. Wren; The yersiniae - a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol*, **2003**, *1*, 55-64.

14. L. Sihvonen , K. Jalkanen , E. Huovinen , S. Toivonen, J. Corander, M. Kuusi, M. Skurnik, A. Siitonen, K. Haukka; Clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A represent two phylogenetic lineages with differing pathogenicity-related properties. *BMC Microb*, **2012**, *12*, 208.
15. A. Rakin, J. Batzilla, D. Garzetti, J. Heesemann; Gains and losses in *Yersinia enterocolitica* subsp. *palaearctica* genomes. *Adv Exp Med Biol*, **2012**, *1*, 23-29.
16. H. Neubauer, S. Aleksic , A. Hensel, E. J. Finke, H. Meyer; *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. *Int J Med Microbiol*, **2000**, *290*, 61-64.
17. R. H. David, T. R. Edward, G. Thomas; *Miscellaneous Bacterial Enteritides // Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease / New York: Elsevier Ltd.*, **2013**, *10*, 71–475.
18. O.L. Henao , T.F. Jones, D.J. Vugia, P.M. Griffin; Foodborne Diseases Active Surveillance Network—2 Decades of Achievements: 1996–2015. *Emerging Infect. Dis.*, **2015**, *9*, 1529–1536.
19. J. Fosse, H. Seegers, C. Magras; Prevalence and risk factors for bacterial food-borne zoonotic hazards in slaughter pigs: a review. *Zoonoses Public Health*, **2009**, *56*, 429-454.
20. European Food Safety Authority; The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010., *EFSA J*, **2012**, *10*, 2597.
21. K.A. Lampel, S. Al-Khalidi, S.M. Cahill, *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins // Bad Bug Book / McLean: International Medical Publishing*; **2009**, *2*, 21-25.
22. R.R. Brubaker; Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae. *Clin Microbiol Rev*, **1991**, *4*, 313
23. M. C. Jennings, K. P. C. Minbiole, W. M. Wuest; Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance. *ACS Infectious Diseases*, **2015**, *7*, 288–303.
24. G. Sun.; Antibacterial textile materials for medical applications // Functional Textiles for Improved Performance / Sawston: Woodhead Publishing Limited, **2011**, *1*, 360–375.



25. C. P. Gerba, Quaternary Ammonium Biocides: Efficacy in Application. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2014**, *2*, 464–469.
26. J. J. Merianos; Surface-active agents // Disinfection, sterilization, and preservation / Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2001**, *1*, 63–320.
27. G. A. McDonnell; Antisepsis, disinfection, and sterilization, Washington: ASM Press, **2007**, 167-183.
28. A. A. Zinchenko, V. G. Sergeyev, K. Yamabe, S. Murata, K. Yoshikawa; DNA compaction by divalent cations: structural specificity revealed by the potentiality of designed quaternary diammonium salts. *Chembiochem*, **2004**, *5*, 360–386.
29. P. Gilbert, A. J. McBain; Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev*, **2003**, *16*, 189–208.
30. R. Bragg, A. Jansen, M. Coetzee, W. van der Westhuizen, C. Boucher; Bacterial Resistance to Quaternary Ammonium Compounds (QAC) Disinfectants. // Infectious Diseases and Nanomedicine II / New Delhi: Springer, **2014**, 1–13.
31. D. J. Weber, W. A. Rutala, E. E. Sickbert-Bennett; Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother*, **2007**, *51*, 4217–4224.
32. B. Meyer, B. Cookson; Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control?, *J Hosp Infect*, **2010**, *76*, 200–205.
33. V. G. Kastbjerg, L. Gram; Industrial disinfectants do not select for resistance in *Listeria monocytogenes* following long term exposure, *Int J Food Microbiol*, **2012**, *160*, 11–15.
34. K. Hegstad, S. Langsrud, B. T. Lunestad, A. A. Scheie, M. Sunde, S. P. Yazdankhah; Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health?, *Microl Drug Resist*, **2010**, *16*, 91–104.
35. J. Bjorland, T. Steinum, B. Kvitle, S. Waage, M. Sunde, E. Heir; Widespread distribution of disinfectant resistance genes among Staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. *J Clin Microbiol*, **2005**, *43*, 4363–4368.
36. E. Heir, G. Sundheim, A. L. Holck; Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistant Staphylococci from the food industry. *Int J Food Microbiol*, **1999**, *48*, 211–219.

37. S. Langsrud, G. Sundheim, R. Brogman-Stahsen; Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp., *J Appl Microbiol*, **2003**, *95*, 874–882.
38. M. A. Schumacher, M. C. Miller, S. Grkovic, M. H. Brown, R. A. Skurray, R. G. Brennan.; Structural mechanisms of QacR induction and multidrug recognition., *Science*, **2001**, *294*, 2158–2163.
39. M. H. Godsey, E. E. Z. Heldwein, R. G. Brennan; Structural Biology of Bacterial Multidrug Resistance Gene Regulators. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 40169–40172.
40. E. d. Hoffmann., V. Stroobant // Principles / Mass Spectrometry : Principles and Applications, Chichester: John Wiley & Sons Ltd, **2007**, 1-4.
41. L. Brown L., J. H. Beynon, Mass spectrometry // Encyclopedia Britannica, 15. izd., SAD, **2010**, 430-435.
42. K. C. de O. Vieira, H. R. A. da Silva, I. P. Masselli Rocha, E. Barboza, L. Kretli, W. Eller; Foodborne pathogens in the omics era. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2021**, *24*, 6726–6741.
43. M. Creydt, M. Fischer; Omics approaches for food authentication. *Electrophoresis*, **2018**, *39*, 1569–1581.
44. A. Valdés, G. Álvarez-Rivera, B. Socas-Rodríguez, M. Herrero, E. Ibáñez, A. Cifuentes // Foodomics: Analytical Opportunities and Challenges / Analytical Chemistry, Washington DC: ACS Publications, **2022**, *1*, 366-381.
45. J. Rizo, D. Guillen, A. Farres, G. Díaz-Ruiz, S. Sanchez, C. Wachter, R. Rodríguez-Sanoja, Omics in traditional vegetable fermented foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2020**, *5*, 791-809.
46. M. Šrajter Gajdošik, U. Andjelković, D. Gašo-Sokač, H. Pavlović, O. Shevchuk, T. Martinović, J. Clifton, M. Begić, D. Josić; Proteomic analysis of pyridoxal oxime derivatives treated *Listeria monocytogenes* reveals down-regulation of the main virulence factor, Listeriolysin O, *Food Res. Int.*, **2020**, *131*, 1-8
47. M. Šrajter Gajdošik, D. Gašo-Sokač, H. Pavlović, J. Clifton, L. Breen, L. Cao, J. Giacometti, D. Josić; Sample preparation and further proteomic investigation of the inhibitory activity of pyridinium oximes to Gram-positive and Gram-negative food pathogens, *Food Res. Int.*, **2013**, *51*, 46-52.

48. J. A. Morcello, H. E. Mizer, P. A. Granato; Laboratory manual and workbook in Microbiology: Application to patient care, New York: McGraw – Hill, **2003**, 188-199.
49. E. K. Barbour, M. A. Sharif, V. K. Sagherian, A. N. Habre, R. S. Talhouk, S. N. Talhouk.; Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.*, **2004**, *93*, 1–7.
50. M. Šrajter Gajdošik, D. Gašo-Sokač, H. Pavlović, J. Clifton, U. Andjelkovic, O. Shevchuk, T. Martinović, D. Josić; Proteomic analysis of food borne pathogens following the mode of action of the disinfectants based on pyridoxal oxime derivative, *Food Res. Int.*, **2017**, *99*, 560-570.
51. D. Gašo-Sokač, M. Katalinić, Z. Kovarik, V. Busić, S. Kovac.; Synthesis and evaluation of novel analogues of vitamin B<sub>6</sub> as reactivators of tabun and paraoxon inhibited acetylcholinesterase, *Food Res. Int.*, **2010**, *187*, 234-237
52. D. Josic, M. K. Brown, F. Huang, H. Callanan, M. Rucević, A. Nicoletti, J. Clifton, D. C. Hixson; Use of selective extraction and fast chromatographic separation combined with electrophoretic methods for mapping of membrane proteins. *Electrophoresis*, **2005**, *26*, 2809–2922.
53. L. Cao, J. G. Clifton, W. Reutter, D. Josic, Mass spectrometry based analysis of rat liver and hepatocellular carcinoma Morris hepatoma 7777 plasma membrane proteome. *Anal. Chem.*, **2013**, *85*, 8112–8120.
54. W. F. Fricke, M. S. Wright, A. H. Lindell, D. M. Harkins, C. Baker-Austin, J. Ravel, R. Stepanauskas; Insights into the environmental resistance gene pool from the genome sequence of the multidrug-resistant environmental isolate Escherichia coli SMS-3-5., *J Bacteriol.*, **2008**, *20*, 67-94.
55. E. E. Jones, T. W. Powers, B. A. Neely, L. H. Cazares, D. A. Troyer, A. S. Parker, R. R. Drake.; MALDI imaging mass spectrometry profiling of proteins and lipids in clear cell renal cell carcinoma, *Proteomics*, **2014.**, *14*, 924–935.
56. D. Binns, E. Dimmer, R. Huntley, D. Barrell, C. O'Donovan, R. Apweiler.; QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. *Bioinformatics*, **2009**, *25*, 3045–3046.
57. F. R. Blattner, The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12. *Science*, **1997**, *277*, 1453–1462.

58. H. Asakura, K. Kawamoto K, S. Murakami, M. Tachibana, H. Kurazono, S. Makino, S. Yamamoto, S. Igimi; Ex vivo proteomics of *Campylobacter jejuni* 81-176 reveal that FabG affects fatty acid composition to alter bacterial growth fitness in the chicken gut, *Res Microbiol.*, **2016**, *167*, 63-71
59. M. J. Osborne, N. Siddiqui, D. Landgraf, P. J. Pomposiello, K. Gehring; The solution structure of the oxidative stress-related protein YggX from *Escherich60ia coli*, *Protein Science*, **2009**, *14*, 1673–1678.
60. Y. Chen, F. Wu, H. Pang, J. Tang, S. Cai, J. Jian; Superoxide dismutase B (sodB), an important virulence factor of *Vibrio alginolyticus*, contributes to antioxidative stress and its potential application for live attenuated vaccine, *Fish Shellfish Immunol.*, **2019**, *89*, 354–360.
61. S. Miravet-Verde, T. Ferrar, G. Espadas-García, R. Mazzolini, A. Gharrab, E. Sabido, L. Serrano, M. L. Senar; Unraveling the hidden universe of small proteins in bacterial genomes. *Mol. Syst. Biol.*, **2019**, *15*, 1-17.
62. L. Chenyang, M. Jayaseelan, T. Christian, A. Thomas, R. Carolin; Isolate Specific Cold Response of *Yersinia enterocolitica* in Transcriptional, Proteomic, and Membrane Physiological Changes, *Frontiers in Microbiology*, **2020**, *10*, 1-14.
63. A. K. Mertz, A. Daser, M. Skurnik, K. H. Wiesmüller, J. Braun, H. Appel, S. Batsford, P. Wu, A. Distler, J. Sieper; The evolutionarily conserved ribosomal protein L23 and the cationic urease beta-subunit of *Yersinia enterocolitica* O:3 belong to the immunodominant antigens in *Yersinia*-triggered reactive arthritis: implications for autoimmunity. *Mol Med.*, **1994**, *1*, 44-55