

Metaproteomika gastrointestinalne mikrobiote zdrave osobe

Svetličić, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:589193>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, Rujan 2018.

Ema Svetličić, 889/MB

**METAPROTEOMIKA
GASTROINTESTINALNE
MIKROBIOTE ZDRAVE OSOBE**

Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Antoniu Starčeviću što mi je omogućio izradu ovog diplomskog rada, na utrošenom vremenu i na ukazanom povjerenju.

Posebno zahvaljujem dr.sc. Damiru Orosu na svom prenesenom znanju, velikom strpljenju i pomoći tijekom izrade diplomskog rada.

Veliko hvala i dr.sc. Mariu Cindriću i dr.sc. Ameli Hozić na utrošenom vremenu i korisnim savjetima.

Zahvaljujem se i doc.dr.sc Jurici Žučku i doc.dr.sc Janku Diminiću na njihovom doprinosu u ovom radu.

Na kraju zahvaljujem obitelji i prijateljima.

Ovaj rad je izrađen u Kabinetu za bioinformatiku na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr.sc. Antonia Starčevića i neposrednim vodstvom dr.sc. Damira Orosa i doc. dr.sc. Jurice Žučka, te na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod neposrednim vodstvom dr. sc. Marija Cindrića i dr. sc. Amele Hozić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Kabinet za bioinformatiku

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

METAPROTEOMIKA GASTROINTESTINALNE MIKROBIOTE ZDRAVE OSOBE

Ema Svetličić 889/MB

Sažetak: Crijevna mikrobiota čovjeka se sastoji od velikog broja mikroorganizama te se njihova disbioza povezuje s mnoštvom bolesti. Identifikacija tih mikroorganizama je vrlo važna kako bi se bolje razumjela veza između bolesti i crijevne mikrobiote. Metaproteomika koja se definira kao identifikacija svih proteina iz mikrobne zajednice nekog uzorka pruža informacije o vrsti mikroorganizma. Zasniva se na digestiji proteina, sekvencioniranju peptida tandemnom spektrometrijom masa i pretragom baza podataka. Cilj ovog rada je bio usporediti utjecaj metoda za izolaciju proteina i utjecaj spektrometra masa te pretražnog programa na taksonomsku kompoziciju crijevne mikrobiote. Rezultati su uspoređeni s literaturnim podacima i s genomskom analizom. Najviše proteina i bakterijskih vrsta je određeno koristeći 4% SDS i B-PER u kombinaciji s ultrazvukom kada se analiza provodila na spektrometru masa ESI-Q-TOF i kada je korišten novorazvijeni bioinformatički program temeljen na LSI. Metagenomska analiza je rezultirala manjim brojem bakterija *Bacteroidetes* nego metaproteomika te se podudarala s rezultatima metaproteomike u koljenima *Firmicutes* i *Proteobacteria*.

Ključne riječi: proteomika, spektrometrija masa, bioinformatički algoritam, LSI, crijevna mikrobiota

Rad sadrži: 65 stranica, 12 slika, 11 tablica, 101 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku i pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Antonio Starčević

Pomoć pri izradi: dr.sc. Damir Oros

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc.dr.sc. Jurica Žučko
2. izv.prof.dr.sc. Antonio Stračević
3. prof.dr.sc. Blaženka Kos
4. izv. Prof. dr. sc. Tonči Rezić

Datum obrane: 24. rujna 2018. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Section for Bioinformatics

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

METAPROTEOMICS OF GASTROINTESTINAL MICROBIOTA OF A HEALTHY PERSON

Ema Svetličić 889/MB

Abstract: Human intestinal microbial consists of a large number of microorganisms and their dysbiosis is associated with a great number of diseases. Identification of these microorganisms is very important in order to better interrupt the connection between the disease and the intestinal microbiota. Metaproteomics, which is defined as the identification of all proteins from a sample, provides information on the species of microorganisms. The workflow consists of digestion of proteins, sequencing of the peptides by tandem mass spectrometry and database searching. The aim of this study was to compare the effect of the protein isolation method and the influence of the mass spectrometer and the bioinformatic tool on the taxonomic composition of the intestinal microbiota. The results were compared with literary data and genomic analysis. The biggest number of bacterial species was determined using 4% SDS and B-PER in combination with sonification when analyzed on ESI-Q-TOF mass spectrometer and when a newly-developed bioinformatic LSI tool was used. Metagenomic analysis resulted in a smaller number of bacteria from phylum *Bacteroidetes* than metaproteomics but it had similar results in phylum Firmicutes and *Proteobacteria*.

Keywords: *proteomics, mass spectrometry, bioinformatic algorithm, LSI, gut microbiota*

Thesis contains: 65 pages, 12 figures, 11 tables, 101 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Antonio Starčević, Associate professor, PhD.*

Technical support and assistance: *Damir Oros, PhD.*

Reviewers:

1. PhD. Jurica Žučko
2. PhD. Antonio Starčević
3. PhD. Bčaženka Kos
4. PhD. Tonči Rezić

Thesis defended: 24th September 2018

Popis i objašnjenje kratica

- DTT ditioneitol
- IAA jodoacetamid
- IPG imobilizirani pH gradijent
- ESI *engl.* electrospray ionization
- LC Tekućinska kromatografija (*engl.* Liquid Chromatography)
- LD Desorpcija laserom (*engl.* Laser Desorption)
- LSI *engl.* latent semantic analysis
- m/z Omjer mase i naboja
- MS *engl.* mass spectrometry
- PMF *engl.* peptide mass fingerprinting
- BLAST *engl.* basic local alignment search tool
- NCBI *engl.* NCBI non-redundant
- NCBI *engl.* National center for biotechnology information
- SDS natrijev dodecilsulfat
- TEMED *N,N,N,N*-tetrametiletildiamin
- TFA trifluoroctena kiselina
- TOF vrijeme leta *engl.* Time of flight

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA.....	2
2.1.1. Metode određivanja sastava i strukture crijevne mikrobiote	3
2.1.3. Razvoj crijevne mikrobiote čovjeka.....	4
2.1.4. Biogeografija ljudske mikrobiote u GI traktu	4
2.1.5. Čimbenici koji utječu na crijevnu mikrobiotu.....	6
2.2. PROTEOMIKA.....	6
2.2.1. Spektrometrija masa.....	8
2.2.1.2. Maseni analizatori.....	10
2.2.1.3. Tandemna masena spektrometrija	11
2.2.1.4. MS ^E	13
2.2.1.5. Maseni spektar	14
2.2.2. Tekućinska kromatografija.....	15
2.2.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	16
2.2.2.2. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti	16
2.2.3. Priprema uzoraka.....	17
2.2.3.1. Izdvajanje bakterijske biomase i liza stanica.....	17
2.2.3.2. Digestija proteina.....	19
2.2.3.3. Pročišćavanje peptida	21
2.2.4. Bioinformatička analiza	22
2.2.4.1. Identifikacija proteina.....	22
2.2.4.2. Proteinske baze podataka.....	23
2.2.4.3. Metaproteomika.....	24
2.3. GENOMIKA	25
2.3.1. Sekvencioniranje nove generacije kao pristup u istraživanju humane mikrobiote	25
2.3.2. Metagenomika.....	25
3. MATERIJALI I METODE	27
3.1. MATERIJALI	27
3.1.1. Laboratorijski pribor	27
3.1.2. Tehnička oprema	27
3.1.3. Kemikalije	28
3.1.4. Biološki uzorak (mikrobna kultura)	29

3.1.5. Priprava otopina i pufera za pripremu uzoraka (otopine za frakcioniranje)	29
3.1.7. Računalni programi za analizu podataka	30
3.2. METODE	31
3.2.1. Izolacija taloga (bakterija) iz smrznutog uzorka humanog fecesa	31
3.2.2. Razbijanje stanica i izolacija proteina	31
3.2.3. Pročišćavanje i digestija proteina FASP metodom	32
3.2.4. Pročišćavanje peptida	33
3.2.5. Analiza peptida UPLC-MS ^E pristupom	33
3.2.6. Priprema uzorka i analiza peptida na spektrometru masa MALDI-TOF/TOF	34
3.2.7. Priprema uzoraka za genomiku	35
3.2.8. Određivanje koncentracije DNA	36
3.2.8. Sekvencioniranje 16S rRNA marker gena	36
3.2.10. Bioinformatička analiza MS/MS spektara metodom baziranom na LSI	37
3.2.11. Obrada podataka sekvencioniranja	37
4. REZULTATI I RASPRAVA	39
4.1. Rezultati analize UPLC-ESI-Q-TOF spektrometrom masa i bioinformatičke analize novorazvijenom metodom baziranom na LSI	39
4.2. Rezultati analize peptida spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF	50
4.2.1. Bioinformatička analiza metodom baziranom na LSI	50
4.2.2. Bioinformatička analiza na ProteinReader-u	54
4.3. Rezultati 16S rRNA sekvencioniranja gena crijevnog mikrobioma	55
5. ZAKLJUČCI	57
6. LITERATURA	58
7. PRILOZI	

1. UVOD

Humani gastrointestinalni trakt je koloniziran vrlo raznolikom mikrobnom zajednicom jednim imenom mikrobiota. Mikrobiota ima ključnu ulogu u zdravlju čovjeka te se njena neravnoteža može povezati s velikim brojem bolesti poput dijabetesa, Crohnove bolesti i kardiovaskularnim bolestima (Clemente i sur., 2012). Promjene u sastavu mikrobiote mogu nastati i uslijed starenja, genetskih mutacija, upala i promjena u prehrani. Zbog svega navedenog mikrobiota je predmet mnogih znanstvenih istraživanja u zadnjem desetljeću. Projekt Humani mikrobiom koji je završio u 2012. godini omogućio je uspostavljanje referentnih baza podataka mikrobnih genoma te postavio temelje daljnjim istraživanjima. Metagenomikom i sekvenciranjem nove generacije (NGS) ustanovljena je kompozicija gena u mikrobioti gastrointestinalnog trakta, no ne pruža informaciju o ekspresiranim genima i njihovoj funkciji. S druge strane metaproteomika koja proučava sve ekspresirane proteine u mikrobnjoj zajednici pruža funkcionalne informacije o mikrobioti.

Za detekciju i identifikaciju svih proteina iz mikrobne zajednice u crijevnoj mikrobioti se koristi masena spektrometrija te se takav pristup naziva i „shotgun“ proteomika. U ovom radu kao uzorak je korišten feces zdrave osobe zbog toga što uključuje neinvazivne metode i predstavlja reprezentativni uzorak crijevne mikrobiote. Za uspješnu analizu potrebna je odgovarajuća priprema uzorka koja uključuje lizu stanica i ekstrakciju proteina što je posebno velik izazov za složene uzorke kao što je feces. Zatim slijedi digestija proteina koja se najčešće provodi tripsinom čije je cijepanje specifično i predvidljivo. Peptidi se separiraju tekućinskom kromatografijom i potom analiziraju tandemnom masenom spektrometrijom. Dobiveni spektri i peptidne mase se uspoređuju s peptidima u bazama podataka, generiranim iz genomskih baza podataka koristeći bioinformatičke alate. Taj postupak je često dugotrajan i zahtjevan zbog stalno rastućih baza podataka. Sužavanje pretrage baze proteinskih sekvenci značajno utječe na rezultate zbog toga što je mikroban sastav fecesa izrazito kompleksan

2. TEORIJSKI DIO

2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA

Ljudski gastrointestinalni trakt predstavlja jednu od najvećih interaktivnih površina (250-400 m²) između domaćina, okolišnih čimbenika i antigena prisutnih u tijelu čovjeka (Thursby i Juge, 2017). Tijekom prosječnog života, oko 60 tona hrane prođe kroz organizam čovjeka zajedno sa mikroorganizmima iz okoliša (Bengmark, 1998). Skupina bakterija, arheja i eukariota koje nastanjuju ljudski gastrointestinalni trakt naziva se crijevna mikrobiota, a koevoluirala zajedno s domaćinom putem složenih i uzajamno korisnih međustaničnih veza (Bäckhed, 2005). Izraz mikrobiota prvi put je upotrijebio Joshua Lederberg, a pod pojmom se podrazumijeva zajednica komenzalnih, simbiotskih i patogenih mikroorganizama koje obitavaju u ljudskom organizmu (Lederberg i McCray, 2001). Procjenjuje se da broj nastanjenih bakterija prekoračuje 10¹⁴ te je time broj bakterijskih stanica deset puta veći nego ljudskih, a količina genoma (mikrobioma) sto puta veća od ljudskog genetičkog materijala (Gill i sur., 2006). Crijevni mikrobiom kodira biokemijske puteve koje ljudski mikrobiom još nije razvio pa se stoga crijevna mikrobiota smatra „posebnim“ organom u intestinalnom traktu sa većim metaboličkim kapacitetom od jetre koja se smatra najsvestranijim ljudskim organom (Egert, 2006).

Mikrobiota pruža mnoge koristi domaćinu, počevši od fizioloških funkcija jačanjem crijevnog integriteta i oblaganjem intestinalnog epitela, zatim prikupljanjem energije, zaštitom protiv patogenih organizama te regulacijom imunoloških i probavnih funkcija domaćina (Gensollen i sur., 2016). Pod regulacijom imuniteta i probavnih funkcija podrazumijeva se sudjelovanje u probavi hrane i razgradnja sastojaka hrane koje ljudi nisu u mogućnosti probaviti, zatim sinteza vitamina B9, B12 i vitamina K (Hill, 1997) te drugih esencijalnih makronutrijenata, konverziju kolesterola i žučnih soli, metabolizam kancerogena i toksičnih tvari, utjecaj na rast i diferencijaciju enterocita, regulaciju crijevnog angiogeneze i zaštitu od patogena (Gérard 2016).

Unatoč tome, navedeni mehanizmi se mogu narušiti djelovanjem promijenjenih mikrobnih uvjeta i uzrokovati ozbiljna oštećenja i oboljenja organizma čovjeka. Uz pomoć sofisticiranih metoda moguće je odrediti i karakterizirati složenije i promjenjive ekosustave i time ih povezati sa raznim oboljenjima intestinalnog trakta (Chang i Lin, 2016 te Schroeder i Bäckhed, 2016).

2.1.1. Metode određivanja sastava i strukture crijevne mikrobiote

Prije jednog desetljeća, sva saznanja o crijevnoj mikrobioti odraslog čovjeka temeljila su se na metodama kultivacije. U novije vrijeme, razvijene su metode visoke razlučivosti i jeftinije cijene sekvencioniranja. Najpoznatije moderne metode analize bakterijske raznolikosti su fluorescentna *in situ* hibridizacija, protočna citometrija, elektroforeza u gradijentu denaturirajućeg agensa, polimorfizam veličine restrikcijskih fragmenata (RFLP), polimorfizam duljine umnoženih fragmenata (AFLP) i kvantitativni PCR. Jedna od prihvaćenijih metoda je ona koja cilja na bakterijske 16S ribosomalne RNA molekule (rRNA) s obzirom da je gen, koji kodira za navedene molekule, prisutan u svim bakterijama i arhejama te sadrži devet visoko varijabilnih regija (V1-V9) što omogućuje lako određivanje vrste (Poretsky i sur., 2014). Većina dosadašnjih saznanja o ljudskom mikrobiomu postignuta su metodama kultiviranja temeljenima na 16S rRNA tehnologiji. Međutim utvrđeno je da od 20% do 60% mikrobima, koji se nalazi u čovjeku, nije moguće kultivirati (Pei i sur., 2004; Verhelst i sur., 2004; Zhou i sur., 2004; Aas i sur., 2005). U posljednje vrijeme, za opisivanje ljudskog mikrobioma koristi se tehnologija sekvencioniranja gena za 16S rRNA. Ova metoda se koristi za identifikaciju bakterija koje se ne mogu kultivirati. Gen za 16S rRNA koristi se i kao metagenomski marker mikrobioma u usnoj šupljini (Faveri i sur., 2008) i na koži (Gao i sur., 2007). U posljednje vrijeme, koriste se manje sekvence gena koji kodira za 16S rRNA (Mizrahi-Man i sur., 2013) iako korištenje manjih sekvenci može dovesti do pogrešaka (Poretsky et al., 2014).

Pouzdanija metoda za određivanje sastava mikrobiote je shotgun sekvencioniranje cijelog genoma mikrobiote (metagenomika) zbog veće razlučivosti i osjetljivosti (Poretsky, 2014). U dosadašnjim istraživanjima identificirano je 2172 vrsti izolirano iz čovjeka koje su klasificirane u 12 rodova, od kojih 93.5% pripada koljenima *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* i *Bacteroidetes*. Tri koljena od navedenih 12 sadrži samo jednu vrstu izoliranu iz čovjeka, uključujući intestinalnu vrstu *Akkermansia muciniphila*, jedinog predstavnika roda *Verrucomicrobia*. 386 identificiranih vrsti iz čovjeka su striktni anaerobi te su stoga prisutni u mukoznim područjima kao što su usna šupljina i gastrointestinalni trakt (Hugon i sur., 2015).

Crijevna mikrobiota nije toliko raznolika kao mikrobiota u drugim dijelovima tijela. U crijevima su prisutni mikroorganizmi specifični za geografsko područje u kojem pojedinac obitava. Također, crijevna mikrobiota uvelike je odođena čimbenicima kao što su prehrana i genetika domaćina (Li i sur., 2014). Međutim treba uzeti u obzir da iako se mikrobiote

razlikuju po sastavu, mogu pokazivati slične profile proteina i metabollita (Moya i Ferrer, 2016).

2.1.3. Razvoj crijevne mikrobiote čovjeka

Vjerovalo se da se mikrobiota počinje stvarati od rođenja, ali dokazano je da su mikrobi prisutni već u placenti (Rodriguez, 2015). Mikrobiotu posteljice čine nepatogene, komezalne bakterije roda *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* i *Bacteroidetes* (Hollister, 2014). Nakon rođenja GI trakt brzo se kolonizira, ali i mijenja pod utjecajem bolesti, tretmana antibioticima i promjenama prehrane (Rodriguez, 2015). Sastav mikrobiote različit je i kod novorođenčadi rođenih vaginalnim putem i onih rođenih carskim rezom. Osim načina poroda, velik utjecaj na sastav mikrobiote ima i način hranjenja.

U ranim stadijima razvoja mikrobiota nije toliko raznolika te dominiraju dva roda *Actinobacteria* i *Proteobacteria* (Bäckhed, 2011). Tijekom prve godine života mikrobna raznolikost se povećava, struktura i sastav postaju sličniji kao kod odraslih organizama, a potpuno se definira do treće godine života. Iako je u odraslog čovjeka crijevna mikrobiota relativno stabilna, ipak postoje oscilacije tijekom života (Dethlefsen i Relman, 2011). Bakterija roda *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* i *Staphylococcus* prvi su aerotolerantni organizmi u crijevu koji se razmnožavaju. Tako se zbog potrošenog kisika, povećava broj fakultativnih anaeroba te anaerobnih organizama iz rodova *Bifidobacterium*, *Bacteroides* i *Clostridium* (Conway, 1995). Kod mlađih osoba *Clostridium* klaster XIV je dominantniji (Claesson i sur., 2011). Kod osoba starijih od 65 godina dominantna je vrsta roda *Bacteroidetes* i *Clostridium* klaster IV, a smanjena je zastupljenost rodova *Bifidobacterium*. Kod starijih osoba mikrobiota ima smanjenu sposobnost proizvodnje kratkolančanih masnih kiselina i amilolizu, biosintezu vitamina B12 te je slabiji odgovor na stres dok je povećana proteolitička aktivnost (Woodmansey i sur., 2004), a udio pripadnika roda *Proteobacteria* i *Staphylococcus* se povećava.

2.1.4. Biogeografija ljudske mikrobiote u GI traktu

Struktura mikrobiote ovisi o fiziološkim svojstvima područja unutar GI trakta, a gustoća i sastav o kemijskom, nutritivnom i imunološkom gradijentu unutar probavnog sustava. U tankome crijevu se nalaze visoke koncentracije kiselina, kisika i antimikrobnih tvari zbog čega se u ovom području hrana brzo probavlja (Donaldson i sur., 2015). Kod miša,

tu prevladavaju vrste porodice *Lactobacillaceae* (Gu i sur., 2015). Suprotno tome, u debelom crijevu rast bakterija je ograničen tako da mogu preživjeti samo brzorastući fakultativni anaerobi sa sposobnošću prijanjanja na epitelno tkivo i koji mogu fermentirati složene ugljikohidrate koji nisu probavljeni u tankome crijevu (Donaldson i sur., 2015). Jedni od značajnijih predstavnika su rodovi *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae* i *Rikenellaceae*.

Iako se sastav mikrobiote razlikuje u različitim dijelovima gastrointestinalnog trakta, mikrobiota ima prilično konzerviran sastav u različitom kolorektalnom, mukoznom području unutar pojedinca (Eckburg, 2005) čak i tijekom lokalnih upala. S druge strane, fekalna i mukozna struktura su značajno različite (Eckburg, 2005). Na primjer, koncentracija roda *Bacteroidetes* značajno je veća u uzorcima fecesa nego u uzorcima sluzi (Eckburg, 2005), a rod *Firmicutes*, posebice *Clostridium*, prisutniji je u sluzi (Van den Abbeele i sur., 2013). Posljednja istraživanja na miševima koji su kolonizirani specifičnom nepatogenom mikrobiotom pokazuju da vanjska sluz debelog crijeva tvori jedinstven mikrobnii profil i da bakterijske vrste prisutne u sluzi pokazuju diferencijalno razmnožavanje i iskorištenje resursa u usporedbi s istima iz unutrašnjosti crijeva (Li i sur., 2015). Zbog navedenog razloga se mora pažljivo odabrati metoda uzorkovanja pri analizi strukture i sastava mikrobiote.

Crijevna mikrobiota odrasle osobe sastoji se većinom od bakterija koje spadaju u grupe koljena *Bacteroidetes* i *Firmicutes*, a potom koljena *Proteobacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Actinobacteria* i *Euryarchaeota* (Voreades i sur., 2014). U probavnom sustavu između jednjaka i debelog crijeva prisutna je značajna razlika u raznolikosti i koncentraciji mikrobiote u rasponu od 10^1 CFU u sadržaju jednjaka i želudca, do 10^{12} CFU u sadržaju debelog crijeva (Jandhyala i sur., 2015). U debelom crijevu prevladavaju bakterije koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* koje čine više od 90% bakterijske populacije. Od patogenih mikroorganizama prisutni su *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* i *Bacteroides fragilis*, ali u vrlo malim koncentracijama. Bakterije koljena *Proteobacteria*, koje su manje zastupljene, zajedno s bakterijama redova *Bacteroides*, *Prevotella* i *Ruminococcus* ukazuju na zdravu crijevnu mikrobiotu.

Veća sličnost mikrobnih gena je pristupa između pojedinaca nego taksonomski profil vrsti što ukazuje na to da se mikrobiota može bolje definirati sa funkcionalne razine nego sa razine organizma (Turnbaugh i sur., 2009).

2.1.5. Čimbenici koji utječu na crijevnu mikrobiotu

Mikrobiota čovjeka ovisi o okolišnim faktorima i uvjetima u domaćinu. Ona je zaštićena od imunološkog sustava domaćina dinamičnom i višestrukom intestinalnom barijerom koja uključuje fizičke (epitelni i mukozni sloj), biokemijske (enzimi i antimikrobni proteini) i imunološke (imunoglobulini A i stanice imunskog sustava povezane s epitelnim tkivom) faktore (Hooper i Macpherson, 2010). Preživljavanje mikrobiote ovisi o njihovom doprinosu glavnim funkcijama čovjeka. Međudjelovanje mikrobnih vrsti omogućuje kolonizaciju većeg broja mikroorganizama.

Crijevna mikrobiota je prilagođena određenom načinu života jer se energija u crijevima dobiva putem fermentacije i redukcije sulfata iz ugljikohidrata. Prehrana uvelike utječe na crijevnu mikrobiotu, kao i izvori i oblici ugljikohidrata. Primjerice intestinalna sluz izvrstan je izvor ugljikohidrata, a najdeblji mukozni sloj nalazi se u debelom crijevu gdje je ključan u povezivanju domaćina i mikrobiote (Gustafsson i sur., 2012). Kako bi mukozni slojevi dobro odrađivali svoju ulogu važna je dugoročna kolonizacija mikroorganizmima. Sluz debelog crijeva sastoji se od dva sloja, unutarnjeg pretežno sterilnog sloja, i vanjskog nastanjenog bakterijama koje koriste glikane iz proteina mucina kao izvore ugljikohidrata.

Neki od faktora koji također utječu na sastav mikrobiote su koncentracija žučne kiseline, imunosni sustav i antimikrobne tvari drugih bakterija i samog domaćina te okolišni faktori (geografski položaj, operativni zahvati, depresije, konzumacija duhanskih tvari, mjesto prebivališta, ksenobiotici). Na raznolikost mikrobne populacije utječu mutacije i horizontalni prijenos gena.

2.2. PROTEOMIKA

Značajnija potreba za analizom cjelokupnih proteina javila se kada je ustanovljeno da je konačni produkt ekspresije gena daleko kompleksniji nego sam gen. Proteomika se razvila zahvaljujući bazama podataka sekvenci DNA i proteina, naprecima u području masene spektrometrije i razvitku računalnih algoritama za pretraživanje baza podataka (Graves i Haystead, 2002).

Izraz „proteomika“ se prvi put spominje 1995. godine, a definiran je kao opsežna karakterizacija i analiza ekspresije gena i cijelog seta proteina koji se nalazi u staničnoj liniji, tkivu ili organizmu pod nazivom proteom (Wasinger i sur., 1995). Pojam proteom (engl.

Protein complement of a genome) potječe od pojmova protein i genom, i uključuje sve proteine i proteinske oblike koje organizam sintetizira tijekom životnog ciklusa.

U područje proteomike pripadaju protein-protein interakcije, modifikacije i funkcije proteina te lokalizacija proteina u stanici. Cilj proteomike nije samo identifikacija svih proteina u stanici nego stvaranje potpune trodimenzionalne mape s položajem proteina u stanici. Potreba za proteomikom se javila s obzirom da o proteinima u stanici ovisi fenotip iste. Nemoguće je samo iz genoma promatrati procese starenja, bolesti i utjecaja okoliša. S obzirom na kompleksnost istraživanja, potrebna su znanja molekularne biologije, biokemije i bioinformatike.

Proteom u stanici je dinamičan te ovisi o uvjetima u kojima se provodi istraživanje. Kao odgovor na unutarnje i vanjske čimbenike, proteini se modificiraju posttranslacijskim modifikacijama (PTM), translociraju unutar stanice, degradiraju se, a primarni transkript se alternativno procesira. Posttranslacijske modifikacije mogu se odrediti jedino analizom proteina, a bitno utječu na funkciju proteina. Zbog navedenog, bilo koji genom može dati beskonačan broj proteoma. Prva važna metoda pri identifikaciji proteina bila je sekvencioniranje proteina Edmanovom degradacijom (Eisenberg i sur., 2000), a zatim i tehnike mikrosekvencioniranja za identifikaciju proteina sa dvodimenzionalne gel elektroforeze. Međutim, najvažnija metoda u identifikaciji proteina je masena spektrometrija (Andersen i Mann, 2000). Masena spektrometrija je doživjela značajan razvoj u instrumentaciji, pripremi uzorka i računalnoj analizi.

Osnovna metodologija proteomike je izolacija proteina iz biološkog materijala, razdvajanje smjese proteina dvodimenzionalnom gel elektroforezom i identifikacija proteina pomoću spektrometrije masa.

Proteomika se grana na nekoliko područja istraživanja, a najvažnije su proteomika koja proučava ekspresiju proteina, strukturalna proteomika i funkcionalna proteomika. Proteomika ekspresije proteina istražuje kvantitativne razlike ekspresije proteina između uzoraka koji se razlikuju po nekoj varijabli. Ona pomaže u otkrivanju novih vrsta proteina u procesu transdukcije ili identificiranju proteina koji se javljaju u bolesti (Graves i Haystead, 2002). Strukturalna proteomika nastoji identificirati sve proteine unutar proteinskih kompleksa ili organela, odrediti njihov položaj u stanici i karakterizirati sve protein-protein interakcije. Naposljetku, funkcionalna proteomika proučava određene skupine proteina i njihov utjecaj u signalizaciji, bolesti i djelovanje s lijekovima.

2.2.1. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (*engl.* mass spectrometry, MS) je analitička metoda koja pruža informacije o masi peptida ili sekvenci aminokiselina u peptidima temeljem omjera mase i naboja, a time se, uz pomoć proteinskih i nukleotidnih baza podataka, može identificirati protein (Graves i Haystead, 2002). Također, pomoću ove metode mogu se odrediti mjesto i vrsta proteinskih modifikacija i struktura organskih tvari. Primjenjuje se u mnogim područjima prirodnih znanosti te u genomici, proteomici, metabolomici, medicini, forenzici i farmaceutskoj industriji.

Pripremljeni uzorak analizira se u masenom spektrometru koji se sastoji od ionizatora, analizatora, detektora i računala. U ionizatoru se tekući ili plinoviti uzorak prevodi u plinovito stanje te ionizira pri čemu nastaju ioni, analizator razdvaja ione ovisno o njihovom omjeru mase i naboja, detektor registrira ione, bilježi njihov broj te omjer mase i naboja, dok računalo obrađuje dobivene podatke i prikazuje ih u obliku masenog spektra. Kada su dva analizatora spojena u jednom masenom spektrometru tada se metoda naziva tandemna masena spektrometrija (MS/MS).

Danas je spektrometrija masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (*engl.* ElectroSpray Ionization, ESI) ili matricom potpomognutu ionizaciju uz desorpciju laserskim zračenjem (*engl.* Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) jedna od najvažnijih metoda analize bioloških molekula (Galić i Cindrić, 2008). Ovo su relativno blage metode ionizacije jer se stvaraju ioni bez značajnog gubitka integriteta uzorka.

S obzirom na to da soli, puferi i detergentski iz gela mogu interferirati sa spektrometrom mase, uzorci se, prije injektiranja u spektrometar mase, moraju pročistiti (Yates, 1998) i koncentrirati. Peptidi se pročišćavaju ZipTipovima (Millipore), poroznim perfuzijskim materijalima (Wilm i Mann, 1996; Wilm i sur., 1996) ili visokotlačnom tekućinskom kromatografijom (*engl.* High-pressure liquid chromatography, HPLC).

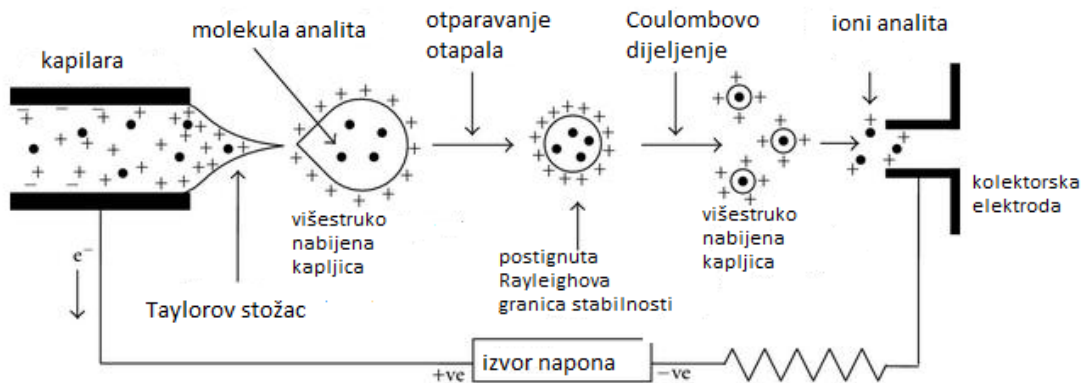
3.2.1.1. Ionski izvori

Ionski izvori uzrokuju stvaranje iona u plinovitom stanju. Fizikalno-kemijska svojstva analita određuju način ionizacije kao i unutarnja energija koja se prenosi tijekom iste. Najčešće korištene metode ionizacije proteina i peptida su matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem te ionizacija elektroraspršenjem.

U spektrometru mase, koji ionizira uzorak elektrorasprešenjem, tekući analit i pokretna faza prolaze kroz kapilaru, koja predstavlja elektrodu pod visokim naponom (2-5kV, Cindrić i sur., 2009). Električno polje dovodi do razdvajanja pozitivnog i negativnog električnog naboja u otopini. Kada je kapilara priključena na pozitivni kraj izvora napona, pozitivno nabijeni ioni putuju prema katodi i nakupljaju se na površini tekućine koja se nalazi na kraju kapilare (Hoffmann i Strobant, 2007). Pri kritičnoj jakosti polja, na vršku kapilare, formira se tzv. Taylorov stožac u kojem se kontinuirano proizvode kapljice s pozitivno nabijenim ionima (Galić, 2004). Kolektorska elektroda privlači takve kapljice i dodatno ih ubrzava. Kako otapalo isparava pod utjecajem struje dušika, temperature i električnog potencijala (ioni unutar otapala pokušavaju doći na površinu) tako se smanjuje veličina kapljica, ali naboj ostaje konstantan (Cindrić i sur., 2009). Kada se sila elektrostatskog odbijanja naboja u kapljici izjednači s površinskom napetošću kapljice, postiže se Rayleighova granica stabilnosti (Galić, 2004).

Nakon što su se dovoljno smanjile kapljice tako da se svi ioni nalaze na površini kapljica, sile kulonskog odbijanja postaju veće od sila napetosti površine, kapljice se otparavaju ili razbiju na manje kapljice (Coulombovo dijeljenje). Nakon otparavanja manjih kapljica, otvor iza kojeg je visoki vakuum i analizator privlači tako formirane kvazimolekulske ione (Cindrić i sur., 2009).

Navedeni način ionizacije analita, prikazan na Slici 1., omogućava analizu relativno malih iona poput peptida te ostalih organskih i anorganskih spojeva, ali i velikih makromolekula jer omogućava analizu molekula bez obzira na veličinu i električni naboj. Značajan napredak postignut je smanjenjem protoka analizirane otopine, nanoraspršenjem, koje omogućava smanjenje količine uzorka i povećanje osjetljivosti metode (Wilm i Mann, 1996).



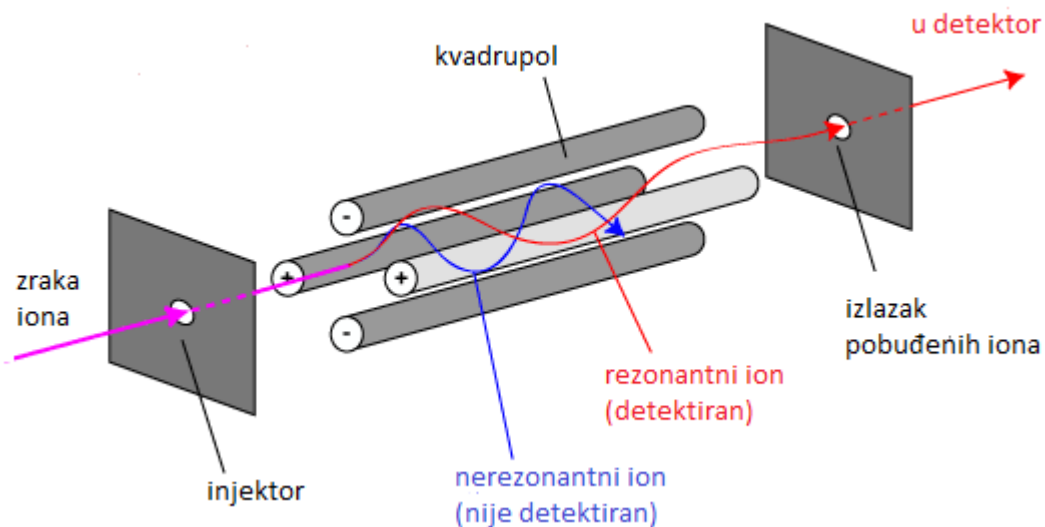
Slika 1. Shematski prikaz ionizacije elektroraspršenjem (Banerjee i Mazumdar, 2012)

2.2.1.2. Maseni analizatori

Formirani ioni dolaze do analizatora gdje se razdvajaju temeljem omjera njihove mase i naboja (m/z). Maseni analizatori koriste statičko ili dinamičko električno polje, dok neki koriste magnetsko polje. Pri prolasku kroz određeno polje u analizatoru, ioni skreću s putanje ovisno o njihovoj brzini, masi ili naboju. Veličina skretanja obrnuto je proporcionalna masi svakog fragmenta. Maseni analizatori se međusobno razlikuju prema osjetljivosti, razlučivosti, točnosti mjerenja mase i gornjoj granici m/z (najveća vrijednost m/z koju uređaj može izmjeriti).

Neki od češće korištenih analizatora mase u istraživanjima su analizator koji mjeri vrijeme leta (*engl.* time-of-flight, TOF), kvadrupolni analizator (*engl.* quadrupole), ionska stupica (*engl.* ion trap, IT) te Fourier transformirana ionska ciklotronska rezonancija (*engl.* Fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR). Najjednostavniji maseni analizator je TOF. Ovaj analizator mjeri omjer mase i naboja (m/z) iona određujući vrijeme prolaska kroz kapilaru određene duljine. Većina ovih analizatora imaju zrcalo na kraju kapilare koje reflektira ione natrag kroz kapilaru do detektora. U ovom slučaju, zrcalo produljuje put koji ion prolazi.

Kvadrupolni analizator sastoji se od četiri paralelne elektrode smještene u vakuumu (Slika 2) koje stvaraju električno polje. Dvije elektrode imaju pozitivni, a druge dvije negativni polaritet. Kvadrupol može propustiti sve ione ili propustiti samo one određenog omjera mase i naboja. Primjenom više kvadrupola može se odrediti sekvenca aminokiselina i peptida.



Slika 2. Presjek kvadrupolnog analizatora (Cindrić i sur., 2009).

Nakon ionizacije elektroraspršenjem, ioni se najčešće razdvajaju kvadrupolnim analizatorima ili analizatorima ionskih stupica (Lane, 2005). Kako bi se poboljšala svojstva masenog spektrometra, sve se više koriste kombinacije dvaju analizatora, istih ili različitih, a njihova najveća prednost je teoretski neograničen raspon masa koje analiziraju, vrlo visoke brzine pregleda (do 10^6 u/s), vrlo visoka snaga razlučivanja te točnost masa u rasponu ppm (Segeer i Griesmacher, 2007). Kod takvih hibridnih analizatora, prvi služi za odabir iona specifičnog omjera mase i naboja, dok se drugi koristi kao krajnji analizator (Galić, 2004). Nakon prolaska kroz analizator, ioni se sakupljaju u kolektoru gdje se vrši njihova detekcija. Samo ioni određene mase dolaze do detektora. Tu nastaje električni signal, koji se pojačava, i zapisuje u obliku spektra mase prema rastućim masama i relativnom intenzitetu. Za detekciju svih iona potrebno je mijenjati jakost magnetskog ili električnog polja.

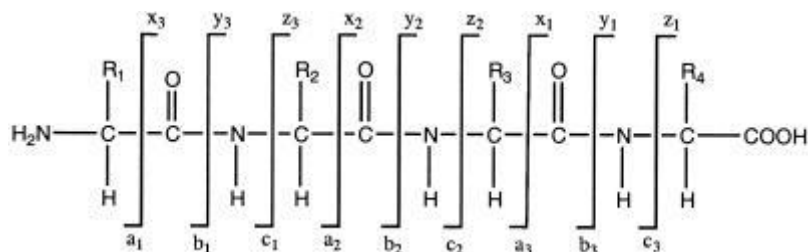
2.2.1.3. Tandemna masena spektrometrija

Tandemna masena spektrometrija (MS/MS) nastaje kada se dva masena analizatora povežu kolizijskom ćelijom. Takvi spektrometri često se nazivaju hibridima. Maseni spektrometar (MS) analizira samo ion prekursor najčešće kvadrupolnim, IT ili TOF analizatorom. Kod tandemne masene spektrometrije, prvi MS filtrira ione prekursore

primjerice peptidne ione, fragmentira ih visokom energijom i plinom dušikom, dok drugi MS filtrira ionske produkte, koji nastaju fragmentacijom.

Način fragmentacije ovisi o uvjetima ionizacije i vrsti instrumenta. Kod ionizacije elektroraspršenjem i primjenom Q-TOF masenog spektrometra, u prvom, kvadrupolnom, analizatoru odabiru se ioni određenog omjera mase i naboja (ioni prekursori) koji se, u kolizijskoj ćeliji, fragmentiraju. Nastali se fragmenti iona prekursora, ioni produkti, zatim analiziraju se analizatorom koji mjeri vrijeme leta. Upotrebom različitih analizatora povećana je rezolucija, osjetljivost i točnost analize. Posljedično, MS/MS pruža uvid u primarnu strukturu proteina, a nastali spektri se lako mogu usporediti s MS spektrima.

Najčešća metoda fragmentacije je kolizijom inducirana disocijacija (*engl.* collision induced dissociation, CID), a zasniva se na sudaru iona prekursora s inernim plinom, dušikom ili argonom, pri čemu dolazi do fragmentacije iona prekursora i stvaranja iona produkata (Wells i McLuckey, 2005). Fragmentacijom peptidnih iona prekursora, dolazi do pucanja kovalentne, peptidne, veze unutar iona. Peptidna veza puca na različitim mjestima unutar peptidnog iona. Kolizije niske energije (CID) fragmentiraju peptide primarno na krajevima. Ako je, nakon cijepanja peptidne veze, naboj sačuvan na N-terminalnom kraju iona, nastali ion naziva se b-ion, dok onaj s nabojem na C-terminalnom kraju, y-ion (Slika 3). Druge metode fragmentacije dovode do nastanka drugih vrsta ionskih produkata (x, y, z i a, b, c) ovisno o mjestu cijepanja peptidnih veza. Iako CID metoda omogućuje stvaranje pojednostavljenih MS/MS spektara (očitanjem samo b- odnosno y- iona unutar jednog MS spektra), interpretacija MS/MS spektara nije jednostavna jer se trebaju uzeti u obzir ioni koji gubitkom -OH, -NH₂ ili CH₃ skupina pridonose kompleksnosti spektara.



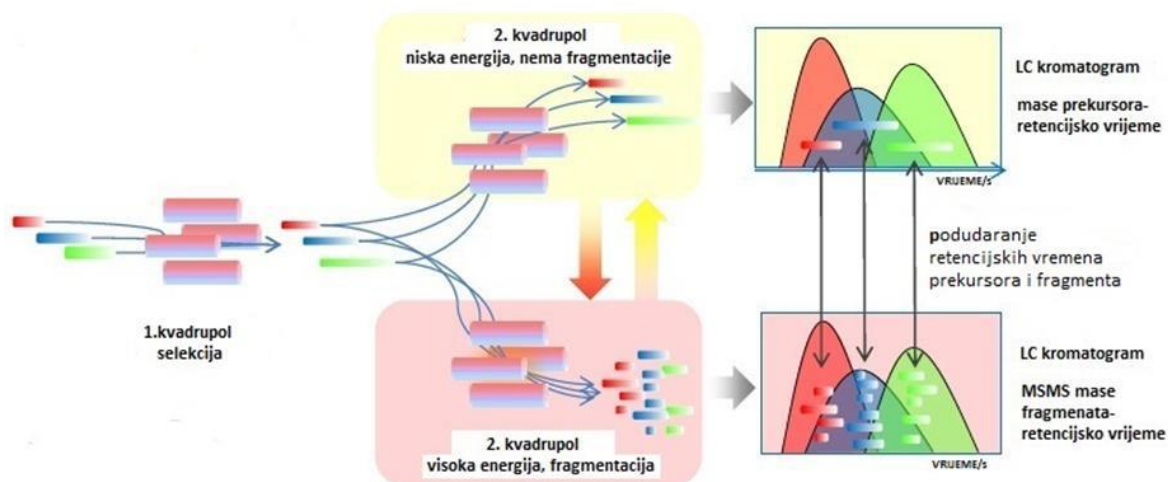
Slika 3. Nomenklatura fragmentacije peptida (Graves i Haystead, 2002).

Razvojem znanosti, moguća je i MS₃ analiza, u kojoj se ioni, koji su prošli tandemnu masenu spektrometriju (ioni produkti), ponovno fragmentiraju.

2.2.1.4. MS^E

Potpunom digestijom 5000-6000 kvašćevih proteina može se dobiti približno 300 000 različitih uzoraka peptida (Cagney i sur., 2003). Kada se takvi peptidi analiziraju standardnom, tandemnom masenom spektrometrijom, sustav odabire ione prekursore za fragmentaciju temeljem njihovog intenziteta, DDA metodom (*engl.* Data dependent acquisition). Peptidni ioni, s najvećim intenzitetom signala na masenom spektru, odabiru se za daljnji proces fragmentacije, a rezultat je maseni spektar koji se uspoređuje s onima u bazi podataka. Nedostatak ove metode je što većina od 300 000 peptida neće biti analizirana pa dolazi do značajnog gubitka informacija. Uslijed toga, razvijena je nova metoda podatkovno neovisnog prikupljanja informacija (DIA, *engl.* Data independent acquisition), poznata pod nazivom MS^E, a E se odnosi na upotrebu povišene energije (*engl.* elevated energy) tijekom prikupljanja podataka (Slade, 2013).

U prvom koraku navedene analize, peptidni ioni prekursori, određenog omjera mase i naboja, nakon elucije s LC-a ulaze u prvi analizator koji propušta sve ione do kolizijske ćelije, u kojoj dolazi do fragmentacije svih propuštenih peptidnih iona uslijed kontinuirane i brze izmjene energije. U drugom koraku se nastali fragmenti peptidnih iona, ioni produkti, analiziraju. Ponavljanjem ovog ciklusa analiziranja prekursora i produkata duž cijelog LC-gradijenta, dobivaju se kromatogrami prekursora i produkata fragmentacije. Prilikom obrade podataka, odgovarajući algoritam usklađuje vrijeme zadržavanja prekursora u koloni s vremenom zadržavanja njihovih iona produkata. Kada nađe savršeno podudaranje između njihovih vremena zadržavanja, pridružuje ione produkte odgovarajućim prekursorima (Slika 4).



Slika 4. Princip MS^E metode u Q-TOF tipu spektrometra masa (Parviainen, 2014)

Velika prednost DIA metode je što nema selekcije iona prekursora stoga ne dolazi do gubitka podataka, a proteini se bolje analiziraju i identificiraju. U tom slučaju, vrlo je bitan odabir programa za obradu podataka dobivenih MS^E analizom jer su nastali maseni spektri vrlo kompleksni.

2.2.1.5. Maseni spektar

U spektru masa svaki signal prikazuje relativnu količinu iona koju daje taj signal. Najviši signal naziva se osnovni signal i njegov intenzitet označava se sa 100, a intenziteti ostalih signala označavaju se relativno prema osnovnome, u postocima. Na ordinati spektra se, dakle, nalazi intenzitet signala izražen u postocima u odnosu na osnovni pik, a na apscisi omjer mase i naboja dobivenih iona. Maseni spektar karakterističan je za svaki organski spoj pa se smatra otiskom prsta svake molekule.

Pik pozitivnog iona, koji predstavlja nedirnutu molekulu (M), umanjen za jedan elektron uklonjen ionizacijom, označava se kao molekulski ion M^+ . molekulski ion se dalje fragmentira. Ukoliko se molekulski ioni ne fragmentiraju, a dođu do detektora, tada maseni spektar prikazuje pik molekulskog iona. Molekulski pik može biti i osnovni pik. Spektri se predstavljaju tablično ili grafički.

2.2.2. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija (*engl.* Liquid Chromatography, LC) je analitička metoda koja se koristi za separaciju otopljenih tvari (Cindrić i sur., 2009). Do separacije dolazi uslijed različitih interakcija komponenata uzorka s nepokretnom i tekućom pokretnom fazom. Razlika interakcije analita s nepokretnom fazom može nastati djelovanjem adsorpcije, ionske izmjene, razdiobe među fazama ili veličine analita koji se razdvajaju (Cindrić i sur., 2009).

Prije upotrebe kolone, otapalo, koje se u eksperimentu koristi kao mobilna faza, propušta se kroz kolonu kako bi se analiza mogla odvijati. U prvom koraku, uzorak se, zajedno s mobilnom fazom, injektira u kolonu. Kako mobilna faza prolazi kroz kolonu, komponente uzorka se, ovisno o afinitetu, polarnosti i strukturnim karakteristikama, vežu na nepokretnu fazu ili prolaze dalje kolonom zajedno s pokretnom fazom. Sastojci smjese se, zatim, u različitom vremenu eluiraju s kolone, prikupljaju i analiziraju. Komponenta uzorka koja ima veći afinitet za nepokretnu fazu, sporije prolazi kroz kolonu nego ona koja ima veći afinitet za pokretnu fazu. . Vrijeme u kojem se tvar eluira (dođe do kraja stupca) naziva se retencijsko vrijeme i karakteristično je za određenu tvar. Efikasnost razdvajanja ovisi o vrsti nepokretne faze te o polarnosti pokretne faze. Najčešće se koristi tekućinska kromatografija obrnutih faza (*engl.* Reverse Phase, RP) koja razdvaja proteine prema njihovoj hidrofobnosti. Nepokretne faze koje se pritom koriste su nepolarni oktadecilsilicijev dioksid, oktalsilicijev dioksid i butilsilicijev dioksid i po njima kolona dobiva ime, dok se polarna, pokretna faza primjenjuje gradijentno, promjenom vrste mobilne faze tijekom eluiranja.

Metode tekućinske kromatografije često se koriste za razdvajanje proteina i peptida jer su isti topivi u vodi ili smjesi vode o pogodnog organskog otapala ko što je acetonitril. Tekućinska kromatografija je, zbog toga, spregnuta s masenim spektrometrom (LC-MS/MS) preko međuspoja (*engl.* Interface), koji otparava otapalo, ionizira neutralne molekule analita i uvodi ih u analizator.

2.2.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl.* High Performance Liquid Chromatography, HPLC) vrsta je tekućinske kromatografije koja se najčešće koristi spregnuta s masenim spektrometrom. Kromatografsko odjeljivanje postiže se prolaskom tekuće pokretne faze, zajedno s analitom, pod tlakom kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama (od 3 do 10 μm) nepokretne faze. Korištenje visokog tlaka povećava linearnu brzinu prolaska pokretne faze i analita kroz kolonu, zbog čega je vrijeme zadržavanja manje, a rezolucija kromatograma veća.

Komponente HPLC sustava su spremnik pokretne faze, sustav za obradu otapala koji uklanja otopljenje plinove, visokotlačna pumpa, injektor, predkolona, kolona, detektor i računalo. Analiza počinje injektiranjem male količine tekućeg uzorka u mobilnu fazu koja dalje prolazi kroz kolonu. Na izlazu iz kromatografa tekućina ulazi u spremnik za otpad. Separacija spojeva proizlazi iz različite pokretljivosti sastavnica uzorka, a brzina kojom se uzorak kreće kroz kolonu ovisi o vremenu zadržavanja u pokretnoj fazi. Ključni dio HPLC-a je detektor koji generira električni signal koji je razmjern intenzitetu neke osobine mobilne faze ili tvari koja se eluira. Koriste se detektori koji prate apsorpciju ultraljubičastog, vidljivog ili infracrvenog zračenja, detektori indeksa loma te fluorescentni i elektrokemijski detektori (Watson, 1999).

2.2.2.2. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti

Tvrtka Waters je 2004. godine predstavila UPLC sustav (*engl.* Ultra-Performance Liquid Chromatography) sa značajno poboljšanom instrumentacijom i tehnologijom u odnosu na istu kod HPLC-a. Acquity UPLC sustav prvi je, komercijalno dostupan, sustav koji može izdržati veće tlakove nego što je do tada bilo moguće.

U dosadašnjim metodama tekućinske kromatografije, tlak koji su sustavi mogli izdržati maksimalno je iznosio 35 do 49 Mpa, dok UPLC može izdržati tlak do 103.5 Mpa. Nadalje, injektor vrlo brzo injektira uzorke, vrlo malih volumena, a kontrolira i temperaturu uzorka. Sve navedeno doprinosi većoj brzini i osjetljivosti UPLC sustava. Također, povećana

je i rezolucija, a smanjena je veličina čestica stacionarne faze (Waters, 2015). Mehanizam razdvajanja isti je kao kod ostalih metoda tekućinske kromatografije.

UPLC je prvi put primijenjen s TOF masenim spektrometrom (Plumb i sur., 2004) u području metabolomike i genomike. Kako se sve veća važnost pridaje brzini i efikasnosti analize tekućinskom kromatografijom, posebno u područjima farmaceutske, toksikološke i kliničke analize, gdje je važno smanjiti cijenu analize, UPLC predstavlja budućnost tekućinske kromatografije (Swartz, 2005).

2.2.3. Priprema uzoraka

2.2.3.1. Izdvajanje bakterijske biomase i liza stanica

Priprema uzorka je kritičan korak u uspješnoj analizi proteoma. U takozvanoj odozdol nagore (engl. Bottom-up) proteomici koja se najčešće koristi postoji niz metoda za ekstrakciju proteina i za njihovu digestiju u peptide (Wisniewski i sur., 2016). Učinkovita ekstrakcija bakterija iz fekalnog uzorka smanjuje kompleksnost analize peptida zbog toga što proteini iz domaćina kao i iz hrane interferiraju u analizi mikrobiote. Metoda diferencijalnog centrifugiranja se pokazala kao učinkovita metoda za ekstrakciju bakterijske biomase iz kompleksnih uzoraka kao što je feces. Metoda se sastoji od tri koraka koja uključuju centrifugiranje pri niskim brzinama kako bi se uklonile netopljive tvari poput neprobavljene hrane, zatim centrifugiranje pri visokim brzinama kako bi došlo do taloženja bakterija i na kraju višestruko ispiranje bakterijske biomase pri visokim brzinama centrifugiranja kako bi se uklonili vezani proteini domaćina i nečistoće (Wu i sur., 2016).

Za razbijanje bakterijskih stanica i ekstrakciju proteina najčešće se koristi mehaničko razbijanje stanica u kombinaciji s pogodnim puferom za liziranje. Različiti protokoli za ekstrakciju proteina rezultiraju višim ili manjim prinosom proteina ovisno o načinu razbijanja stanica, te o puferu za liziranje koji se koristi (Zhang i su., 2017). Visoka učinkovitost ekstrakcije postiže se metodom razbijanja stanica sitnim kuglicama „bead beating-om“ i sonifikacijom tj. ultrazvučnim razbijanjem u kombinaciji s nekim od detergenata (Feist i sur., 2015). Ekstrakcija proteina ultrazvukom omogućuje visoku reproducibilnost, kraće vrijeme postupka, jednostavno rukovanje, zbog hlađenja niže temperature uz manju potrošnju otapala (Cailli i sur., 2006), (Chemat, Tomao i Viro, 2008). Kavitacije koje nastaju tijekom tretiranja

ultrazvukom uzrokuju bubrenje stanica i posljedično vode do pucanja stanične stjenke, te oslobađanja staničnih sastojaka između ostalog i proteina (Vinatoru, 2001), (Drmić i Jambrak, 2010). Za uspješan proces sonifikacije može se reći da je važan izbor otapala, optimalne frekvencije, vremena tretiranja, te snage ultrazvuka (Wang i Weller, 2006). Bitno je da se detergent doda prije tretiranja s ultrazvukom, a nakon razbijanja stanica uzorak drži u kipućoj vodenoj kupelji. Detergenti razbijaju protein-protein veze, protein-lipid i lipid-lipid veze, denaturiraju proteine pa se koriste za razbijanje staničnih membrana i oslobađanje intracelularnog sadržaja u topljivom obliku. Nakon ekstrakcije proteini se izdvajaju centrifugiranjem pri velikim brzinama time što se bakterijske stanice talože, a proteini ostaju u supernatantu.

Najčešće korišteni detergents prikazani su u Tablici 1. Međutim, bez obzira na njihova pozitivna svojstva detergenati nisu nimalo poželjni kod enzimske digestije, a po pravilu moraju se ukloniti prije same analize na spektrometru masa zbog interferencije na kromatografiji obrnutih faza (Zhou i sur., 2012).

Kako bi se dobio uzorak kompatibilan za analizu na LC-MS/ potrebno je nekoliko koraka pročišćavanja uzorka koji uključuju početnu ekstrakciju proteina, enzimsku digestiju proteina u peptide, pročišćavanje peptida i opcionalno frakcioniranje peptida. Nerijetko se dodaju detergents i kaotropi koje treba ukloniti prije digestije i LC-MS analize. Post razne strategije kojima se uklanjaju soli, detergents i kaotropi, a uključuju afinitetne metode, membranske filtracije, elektroforetske metode te precipitaciju proteina. Iako su ovi pristupi učinkoviti u uklanjanju kontaminan, često su dugotrajni i zahtijevaju dodatne korake koji mogu rezultirati gubitkom uzorka (Sielaff i sur., 2017). Prije digestije proteini se moraju denaturirati i reducirati što se najčešće postiže reagensima kao što su DTT, merkaptoetanol ili tris-fosfin (Hale i sur., 2004). Najčešće se koristi DTT koji je jaki reducirajući agens koji reducira disulfidne veze i sprječava stvaranje intra i inter molekulskih veza između cisteinskih ostataka. Isto tako bitna je alkilacija cisteinskih ostataka da bi se spriječila renaturacija, za što se često koristi jodoacetamid (IAM) ili jodoctena kiselina (IAA) (Hustoft i sur., 2015).

Tablica 1: Prikaz najčešće korištenih detergenata za lizu stanica i masenu spektrometriju (Swiderek i sur. (1995))

Detergent	Tip	Molekularna masa	Preporučeno odstranjivanje
Triton X-100	Ne-ionski	647	TCA/Aceton
NP-40	Ne-ionski	617	Aceton
Tween 20	Ne-ionski	1228	Aceton
Tween 80	Ne-ionski	1310	Aceton
Ocetil Glukozid	Ne-ionski	292	Etil acetat
Ocetil Tioglukozid	Ne-ionski	308	Etil acetat
Big CHAP	Ne-ionski	878	filtracija
Deoksikolat	ionski	415	Aceton, TCA
SDS	ionski	288	Filtracija/FASP
CHAPS	Zwiteronski	615	Filtracija
CHAPSO	Zwiteronski	631	filtracija

2.2.3.2. Digestija proteina

Tripsin je najčešće korišten proteolitički enzim zbog visokospecifične reakcije koju katalizira; hidrolizira samo peptidne veze u kojima karbonilna grupa slijedi nakon aminokiselinskog ostatka arginina ili lizina s iznimkom kada su lizin ili arginin povezani s aspartatom te ako lizin i arginin slijede nakon prolina. Triptički fragmenti stoga su peptidi s aminokiselinskim ostatkom argininom ili lizinom na C-kraju. Digestija proteina tripsinom se provodi u optimalnom pH 7.5-8.5 pri temperaturi 37 °C s dodatkom 50mM ABC pufera koji osigurava optimalni pH. Za uspješnu digestiju također je potrebno optimirati omjer enzima i supstrata te trajanje same reakcije.

Digestija u otopini i digestija u gelu su dva pristupa u pripremi uzorka za LC-MS. Digestija u otopini je najjednostavnija i najčešće korištena tehnika te uključuje denaturiranje, alkiliranje i samu digestiju uzorka proteina. Nakon digestije u otopini najčešće slijedi frakcionacija peptida, no ona se može provoditi i prije digestije koristeći razne oblike kromatografije kao što su ionska izmjena, kromatografija obrnutih faza, gel filtracija, itd. (Feist i sur.,2015). Prednosti digestije u otopini su jednostavnost i manji gubitak proteina. U metodi digestije u gelu koja je također u širokoj upotrebi, prije digestije slijedi separacija proteina elektroforezom u gelu.

Iako se pojavila prije 32 godine i dalje je najučinkovitija pri odvajanju kompleksnih smjesa proteina (Laemmli, 1970). Većinom je ovo najsporiji dio proteomske analize jer je

jednodimenzionalna ili dvodimenzionalna elektroforeza spora metoda koju nije lako automatizirati. Međutim, dok se ne razvije nova metoda, ovo je i dalje najvažniji dio proteomike.

Za mnoga istraživanja, dovoljna je jednodimenzionalna gel elektroforeza (1-DE) u kojoj se proteini razdvajaju prema molekularnoj masi. Proteini su otopljeni u natrijevom dodecil sulfatu (engl. Sodium dodecyl sulfate) stoga su proteini istoga naboja. Ova metoda je jednostavna, reproducibilna i može razdvojiti proteine molekulske mase od 10 do 300 kDa, a najviše se primjenjuje nakon pročišćavanja proteina.

Za kompleksnije uzorke primjenjuje se dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE) u kojoj se proteini razdvajaju prema dva svojstva, prvo naboju, a zatim molekularnoj masi. Najvažnija prednost ove metode je što može razdvojiti proteine s posttranslacijskim modifikacijama jer iste daju određeni naboj i dovode do promjene molekulske mase proteina. Glavna primjena 2-D elektroforeze je određivanje ekspresije proteina koja se može kvalitativno i kvantitativno usporediti među uzorcima ovisno o prisustvu ili odsutnosti te intenzitetu točki. Zatim, primjenjuje se i u određivanju proteina unutar mikroorganizama (Shevchenko i sur., 1996), staničnih organela (Jung i sur., 2000) te proteinskih kompleksa (Rappsilber i sur., 2000). Jedan 2-DE gel može razdvojiti tisuće proteina (Dunn, 2000). Reproducibilnost ove metode poboljšana je upotrebom imobiliziranog pH gradijenta (Bjellqvist, 1993). Fluorescentne boje unaprijedile su osjetljivost detekcije proteina (Patton, 2000), a povećanje brzine omogućilo je izvođenje u minigelovima (Sanchez i Hochstrasser, 1999).

Unatoč nastojanjima da se 2-D elektroforeza automatizira, i dalje je vrlo iscrpljujuća i dugotrajna metoda. Jedan 2-DE eksperiment može potrajati dva dana, a moguće je samo jedan uzorak analizirati po gelu. Također, ova metoda može razdvojiti samo određeni broj i vrstu proteina pa tako ne može u potpunosti razdvojiti eukariotski, stanični lizat u jednom 2-D gelu (Celis i Gromov, 1999), a veliki i hidrofobni proteini uopće neće prodrijeti u gel. Još jedan nedostatak ove metode je nemogućnost određivanja proteina koji su manje zastupljeni u stanici pri analizi cijelog staničnog lizata (Gygi i sur., 1999). Pri analizi kvašćevih proteina, ni jedan protein, koji je u malom broju prisutan u stanici, nije bio vidljiv u 2-D gelu (Gygi i sur., 1999) što je veliki problem jer više od polovice gena u kvascima kodira za te manje zastupljene proteine (Goffeau i sur., 1996). Dijelovi gela s proteinima se izrezuju i podvrgavaju digestiji. Prednost takvog pristupa je analiza kompleksnijih smjesa proteina. S

obzirom na navedene nedostatke dvodimenzionalne gel elektroforeze, koriste se druge metode za separaciju proteina.

FASP (Filter-Aided Sample Preparation) metoda koristi se za pročišćavanje i proteolizu uzorka proteina koji su prvenstveno namijenjeni analizi na spektrometru masa. Metoda koristi razne komercijalno dostupne kolone za ultrafiltraciju (filteri različitih veličina pora) kojima je moguće ukloniti različite kontaminante centrifugiranjem, gdje proteini ostaju na membrani i lako ih je resuspendirati u pogodnom puferu (Manza i sur., 2005). FASP je dizajniran kako bi se jednostavnije uklonili detergentski i reducirajući agensi koji su prethodno korišteni u ekstrakciji, te redukciji disulfidnih mostova prisutnih proteina. (Nel i sur., 2016). Membrana inače služi kao pogodno mjesto gdje se kompleksne smjese proteina prvo modificiraju, a potom hidroliziraju s nekom od proteaza (Potriquet i sur., 2016). Peptidi dobiveni hidrolizom proteina dovoljno su mali da prođu pore filtra pa se sakupljaju jednostavnim centrifugiranjem. Osim originalne FASP metode razvijene su razne druge modifikacije s ciljem poboljšanja osjetljivosti.

2.2.3.3. Pročišćavanje peptida

Prije LC-MS/MS analize peptide je potrebno pročitati od pufera i soli, koji su dodani tijekom pripreme uzoraka, zbog mogućeg negativnog utjecaja na samu analizu. Pročišćavanje, a ujedno i koncentriranje peptida moguće je provesti ZipTip tehnikom koja rezultira visokim prinosom, jednostavna je za korištenje i komercijalno dostupna po relativno niskoj cijeni (Capelo i sur., 2009). Radi se o nastavku za pipetman od 10 μ l koji u završetku sadrži kruti nosač nepokretne faze npr. oktadecilsilicijev oksid (C18). Glavni nedostatak ZipTip metode je mala količina proteina koja se veže na punilo bez da dođe do gubitaka (Hufstoft i sur., 2015). Osim ručne ZipTip metode na tržištu postoji i automatizirani uređaj (Automated Liquid Handling Platform) koji kod većeg broja uzoraka može skratiti vrijeme samog pročišćavanja. Postupak pročišćavanja kao i kod ZipTipe se temelji na principu tekućinske kromatografije obrnutih faza (eng. Reversed Phase). Kolona se prvo kondicionira, zatim se na nju vežu peptidi iz uzorka, potom se peptidi vezani za nepokretnu fazu ispiru od soli i ostalih nečistoća polarnim otapalom, da bi na kraju peptidi bili eluirani otopinom manje polarnosti.

2.2.4. Bioinformatička analiza

2.2.4.1. Identifikacija proteina

Podaci dobiveni analizom na spektrometru masa prikazuju se kromatogramima, gdje pikovi predstavljaju m/z vrijednosti, a visina pika relativni intenzitet signala. Jačina intenziteta ovisi o detektiranoj količini iona iste m/z vrijednosti. Za obradu prikupljenih podataka koriste se bioinformatički alati. U identifikaciji peptida imamo dva osnovna pristupa a to su pretraga preko baze podataka i identifikacija sekvencioniranje peptida *de novo*. Pretraga putem baza podataka zasniva se na usporedbi eksperimentalno dobivenih spektara s teorijskim spektrima koji se nalaze u bazama podataka, a dobiveni su *in silico* cijepanjem proteina nekom peptidazom, uglavnom tripsinom. Kad izračunata masa peptida odgovara masi promatranog proteina računaju se mase očekivanih fragmentiranih iona i podaci se uspoređuju s eksperimentalnim vrijednostima. Metoda koja se često spominje kod MS analiza je metoda „otiska prsta“ mase peptida (engl. Peptide Mass Fingerprinting), dok se kod tandemne spektrometrije masa češće spominje tehnika odozdol nagore. Identifikacija proteina pretraživanjem baza podataka smatra se najefikasnijom metodom identifikacije, no usprkos kontinuiranom rastu i ažuriranju mnogi proteini ne nalaze se u bazama. Danas postoje brojni programi koji pretražuju baze podataka poput programa MASCOT, SEQUEST, X!, OMSSA, Tandem, itd.

Pristup *de novo* sekvencioniranja peptida koristi se kad pretraživanje preko baza podataka se omogućava identifikaciju proteina (Seidler i sur., 2010). Problem *de novo* sekvencioniranja je što za analizu kompleksnih podataka zahtjeva visoko-kvalitetne MS/MS spektre (Nesvizhskii i sur., 2010). Programi koji se najčešće koriste za *de novo* sekvencioniranje su MASCOT i PEAKS (Ma i sur., 2003). Također se koriste programi Lutefisk (Johnson i Taylor, 2002), PepNovo (Frank i Pevzner, 2005), NovoHMM (Fischer i sur., 2005), SeqMS (Fernandez-de-Cossio i sur., 2000), AuDeNs (Grossmann i sur., 2005) i drugi (Allmer, 2011).

MASCOT je pretraživački program koji se koristi za analizu MS i MS/MS spektara i u kojem su moguća sva tri tipa pretrage: pretraživanja pomoću otiska prsta, pretraživanja pomoću aminokiselinskih sekvenca kao upita i MS/MS pretraživanja iona. Pripada skupini probabilističkih pretražnih programa što znači da računava vjerojatnost da je podudaranje između spektara slučajno. Ovakav pristup ima brojne prednosti: jednostavnim pravilima se

može odrediti je li rezultat značajan ili ne, rezultati se mogu usporediti s onima iz drugačijih tipova pretrage, parametri pretrage se mogu optimizirati iteracijom (Perkins i sur., 1999).

PEAKS se koristi za identifikaciju peptida koristeći pretragu baze podataka. No, za razliku od klasične pretrage ovaj program se oslanja na rezultate *de novo* sekvenciranja kako bi poboljšao filtraciju podataka i scoring funkciju. Kombiniranjem pristupa uvelike se poboljšava osjetljivost i točnost u usporedbi s klasičnim programima za pretragu baza podataka (Zhang i sur., 2015).

Drugačiji pristup opisanim programima je jest tretiranje bioloških sekvenci (DNA, RNA i protein) kao vektore po uzoru na obradu govornog jezika. Svaka proteinska sekvenca je ugrađena u n-dimenzionalni vektor koji karakterizira biofizička i biokemijska svojstva sekvence koristeći neuralne mreže.

2.2.4.2. Proteinske baze podataka

Izbor baze podataka za proteinske sekvence dobivene masenom spektrometrijom ovisi o ciljevima eksperimenta i vrsti organizma. Dostupan je velik broj baza podataka ovisno o organizmu. Kada je riječ o ljudima, postoji nekoliko različitih baza koje se razlikuju u dopunjenosti, redundantnosti, kvaliteti i anotaciji. S dostupnošću više od 165 gotovih genomskih sekvenci iz eukariotskih i prokariotskih baza fokus se prebacuje na identifikaciju i funkcionalnu analizu proteina. Univerzalne baze podataka sadrže informacije o određenoj obitelji proteina ili grupi proteina ili se odnose na specifični organizam.

UniProt je besplatan i lako dostupan centralizirani repozitorij proteinskih sekvenci čiji je cilj anotacija, inkorporiranje, interpretacija te standardiziranje proteinskih podataka iz različitih disperziranih izvora kako bi činio najcjelovitiji katalog proteinskih sekvenci i funkcionalne anotacije. Sastoji se od četiri komponente optimizirane za različite svrhe; UniProtKB, UniProt Parc, UniRef i UniMes. UniProtKB baza podataka (The UniProt knowledgebase) sadrži velik broj proteinskih sekvenci i detaljnu anotaciju vezanu za te podatke te se sastoji od dva dijela; UniProtKB/Swiss-Prot and UniProtKB/TrEMBL (The UniProt Consortium, 2010).

UniProtKB/Swiss-Prot je provjerena neredundantna baza proteinskih sekvenci u kojoj su proteini eksperimentalno okarakterizirani, a razlikuje dva razreda podataka: osnovni („core“) podaci i anotacije. Osnovni podaci se sastoje od sekvencija proteina, bibliografske reference,

taksonomije, dok se u anotacijama može pronaći funkcija proteina, posttranslacijske modifikacije (fosforilacija, acetilacija, glikozilacija, itd.), domene i mjesta vezanja liganda, sekundarna struktura proteina, kvarтерна struktura, sličnosti s drugim proteinima te bolesti povezani s deficijencijom proteina (Bairoch i sur., 2000). Ostale sekvence se nalaze u „neprovjerenom“ dijelu UnProtKB poznatom kao UniProtKB/TrEMBL. Podaci u TrEMBL dijelu nisu ručno provjereni i velikim dijelom su derivirani iz podataka dobivenih sekvenciranjem DNA. Podaci su dopunjeni s automatski generiranim anotacijama kao i u Swiss-Prot dijelu.

NCBIInr (engl. NCBI non-redundant, NCBIInr) je neredundantna proteinska baza podataka razvijena os strane Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI engl. National center for Biotechnology Information). U njoj su sadržani zapisi iz nekoliko baza podataka poput GenBank baze podataka (Benson i sur., 2011), kao i baza podataka SwissProt (Boeckmann i sur., 2003), PDB (Berman, 2008), PIR (engl. Protein information resource, PIR)(Wu i Nebert, 2004) i NCBI RefSeq (Pruitt i sur., 2005). Podaci u NCBIInr bazi podatak se nalaze u obliku FASTA formata zapisa koji se pretražuje BLAST-om. programski paket BLAST je skup alata koji se koristi za pretragu i indeksiranje DNA i proteinskih baza podataka.

2.2.4.3. Metaproteomika

Metaproteomika se definira kao identifikacija svih proteina dobivenih ekspresijom iz kompleksnog mikrobnog ekosistema (Willems i Bond, 2004) poput humanog mikrobioma, oceana, otpadnih voda, hrane, itd. Pokazalo se da aplikacija proteomike i metaproteomike na crijevnu mikrobiotu domaćina osigurava vrijedne informacije o ulozi same mikrobiote. (Verberkmoes i sur., 2009). Prednost metaproteomike u odnosu na metagenomiku i metranskriptomiku jest što daje informacije o interakciji proteina u domaćinu što u konačnici omogućava bolje razumijevanje fizioloških i patoloških stanja domaćina (Willems i sur., 2015). Analiza se uglavnom sastoji od prikupljanja uzorka, ekstrakcije proteina, frakcioniranja, masene spektrometrije i pretrage baze podataka (Kolmeder i de Vos, 2014). Ograničenja s kojima se znanstvenici susreću tijekom istraživanja metaproteomike crijevne mikrobiote su nemogućnost detektiranja low abundant proteina, velika raznolikost crijevne mikrobiote te niska učinkovitost u detektiranju peptida ili proteina iz dobivenih MS spektra

što se pripisuje manjku odgovarajućih baza podataka. Nadalje uspješnost metaproteomske analize humanog mikrobioma uvelike ovisi o protokolu ekstrakcije bakterijske biomase i proteina.

2.3. GENOMIKA

2.3.1. Sekvencioniranje nove generacije kao pristup u istraživanju humane mikrobiote

Ubrzan razvoj sekvencioniranja nove generacije („Next Generation Sequencing, NGS“) imao je velik utjecaj na ubrzanje sekvencioniranja te je u isto vrijeme smanjio troškove i omogućio danji razvoj metagenomike. Koristeći NGS, moguće je okarakterizirati specifični mikrobiom kvantitativno i kvalitativno bez kultivacije mikroorganizama. Strategije NGS-a i dalje ovise o kontinuiranoj nadogradnji baza podataka, bioinformatičkih alata i funkcionalnim informacijama (Argenio *isur.*, 2015). Jedna od strategija NGS-a jest 16S rRNA sekvencioniranje koje se često koristi za određivanje filogenije. 16S rRNA gen karakteriziraju hipervarijabilne regije isprekidane s ultrakonzerviranim regijama za koje su konstruirane univerzalne početnice (Woese i *sur.*, 1975). Time je omogućena amplifikacija hipervarijabilnih regija, svih bakterija u ciljanom okolišu u samo jednoj PCR reakciji. Te regije se mogu poravnati s poznatim sekvencama u bazama podataka i tako odrediti taksonomiju (Yarza i *sur.*, 2014). Razvijeni su različiti alati za analizu i interpretaciju kompleksnih podataka dobivenih 16 S NGS-om. Većina tih metoda uključuje taksnomsku identifikaciju i analizu raznolikosti (Caporaso i *sur.*, 2012). Taksonomska identifikacija uvelike ovisi o metodi pripreme uzorka i količini 16S rRNA koja je sekvencirana te je moguća između koljena i roda, dok je identifikacija vrste složenija (Veltorvsky i Baldrian, 2013).

2.3.2. Metagenomika

Metagenomika se bavi proučavanjem genetskog materijala dobivenog neposredno iz okoliša. Dok se klasična mikrobiologija temelji na kultivaciji mikrobnih kultura, metagenomika otkriva funkcionalnu i filogenetsku kompoziciju mikrobnih zajednica u njihovom prirodnom okruženju (Handelsan i *sur.*,). To se postiže ekstrakcijom genomske

DNA direktno iz okolišnog uzorka, sekvencioniranjem i bioinformatičkom analizom podataka. Trenutno su najčešće korištene metode sekvencioniranja pirosekvencionirne i Illumina sekvencioniranje (Edwards i sur.,).

Ustanovljeno je da velika većina mikroorganizama nije detektirana metodama kultivacije te je metagenomika zaslužna za identifikaciju mikroorganizama u različitim staništima poput oceana, tla, termalnih izvora, itd. Metagenomika također igra važnu ulogu u razumijevanju humanog mikrobioma, prvenstveno mikrobiote gastrointestinalnog trakta, identifikaciji novih gena i determinaciji posljedica mikrobiološke neravnoteže. Kombiniranjem metagenomike, metatranskriptomike, metabolomike i metaproteomike će također pomoći u razumijevanju funkcije humanog mikrobioma i osigurati nove strategije za dijagnozu i liječenje bolesti povezane s gastrointestinalnim traktom (Wang i sur., 2015).

3.MATERIJALI I METODE

*Etičko pitanje : Sav rad i metode u njemu kroištene dobili su etičke potvrde od strane PBF-a i KB Srebrnjak na temelju HRZZ projekta IP-06-2016 "MicroEquilibrium".
Potvrde se nalaze u prilogu 4.*

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Laboratorijski pribor

- Automatske pipete (20, 200, 1000, 5000 μ L)
- Kivete po Eppendorfu različitih volumena((2,1.5, 0.5, 0.2 mL)
- Falcon kivete 15 mL
- Laboratorijske žlice
- Markeri za pisanje
- Papir za vaganje i zamatanje čepova
- Pipetni nastavci
- Staklene čaše
- Staklene i plastične menzure različitih volumena
- Microcon YM-30, CAT No. 42409 (Millipore)
- Microcon YM-10, CAT No. 42408 (Millipore)

3.1.2. Tehnička oprema

- Analitička vaga, *Mettler Toledo, Švicarska*
- Analitička vaga model Eclipse EBL 314i, Adam, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Automatizirani uređaj za pročišćavanje proteina
AssayMAP Bravo Automated Liquid Handling Platform, *Agilent Technologies, SAD*
- Centrifuga 5415 R, *Eppendorf, Njemačka*
- Centrifuga Centric 400, *Tehtnica, Slovenija*
- Magnetska mješalica s zagrijavanjem RCT basic, *IKA, Japan*
- Sonifikator Mini20, *Bandelin, Njemačka*
- MiniSpin centrifuga, Eppendorf, Njemačka
- Vorteks MS 3 basic, *IKA, Japan*
- Termomiješalica Comfort, *Eppendorf, Njemačka*

- Ultra Performance Liquid Chromatography system (nanoACQUITY UPLC, Waters, USA)
- Zamrzivač Forma 900 (-86 °C), Thermo scientific, Njemačka
- Zamrzivač, *Gorenje, Slovenija*
- Analitička vaga (ADAM, Eclipse)
- Centrifuga (Universal 320 R)
- Vorteks (LLG Labware, uniTEXER)
- Magnetska mješalica s zagrijavanjem (IKA, RTC basic)
- Hladnjak, Beko, Turska
- Maxwell 16 (Promega)
- BioSpec Nano-drop spektrofotometar (Shimadzu Biotech)

Sve analize provedene su na instrumentu ESI SYNAPT G2-Si (*Waters, Milford, MA, SAD*) i nanoACQUITY UPLC-u (*Waters, USA*).

3.1.3. Kemikalije

- Acetonitril
- Amonijev formijat, $\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-$, *Fluka, Njemačka*
- Amonijev acetat, $\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$, *Fluka, Njemačka*
- Amonijev hidroksid, NH_4^+OH^- , *Sigma-Aldrich, SAD*
- Amonijev sulfat, *Sigma, SAD*
- B-PER, *Sigma, SAD*
- Ditiotreitol (DTT), *Sigma, SAD*
- Etanol, *Kemika, Hrvatska*
- Jodoacetamid (IAA), *Sigma, SAD*
- Kalijev dihidrogenfosfat
- Kalijev klorid
- Mravlja kiselina
- MQ H₂O
- Natrijev acetat,
- Natrijev citrat, Natrijev klorid (
- Natrijev hidrogenfosfat
- Natrijev dodecilsulfat (SDS), *Sigma Aldrich, SAD*

- PlivaSept Tinktura, *Pliva*, Hrvatska
- Tripsin, *Merck*, *Njemačka*
- Tris, *Sigma*, *SAD*
- Urea, *Sigma*, *SAD*

3.1.4. Biološki uzorak (mikrobna kultura)

U ovom radu korišten je uzorak fecesa zdravog donora. Osoba nije konzumira lijekove ili supstance koje bi mogle interferirati sa sastavom crijevne mikrobiote. Uzorak je ubrzo nakon prikupljanja čuvan na -20°C do analize.

3.1.5. Priprava otopina i pufera za pripremu uzoraka (otopine za frakcioniranje)

Fosfatni pufer (Phosphate Buffer Saline, PBS)

pH pufera se podesi na 7,2 te se dodaje vode do konačnog volumena od 1 L. Vrijednost pH ovako pripremljenog PBS pufera iznosi između 7,1 i 7,3.

Otopina amonijevog hidrogenkarbonata

Pufer je napravljen otapanjem 3,95 g NH_4HCO_3 u 950 mL demineralizirane vode. Nakon što je pH vrijednost podešena na 7,8 s fosfatnom kiselinom volumen je nadopunjen do 1000 mL.

Otopina tripsina

Otopina tripsina je priređena dodavanjem 50 μL ultračiste demineralizirane vode (MQ) na 50 μg liofiliziranog tripsina pri čemu je dobivena koncentracija tripsina od 1 mg/mL.

Otopina Urea/ Tris-HCL(UA)

8 M otopina UA je pripremljena dodavanjem 0.96 g ureje u 2 mL 0.1 M Tris-HCl pufera (pH 8,0).

Otopina ditiotreitola (DTT)

10 mM DTT otopina se priprema otapanjem 1.54 mg DTT-a u 1 mL UA otopine prethodno pripremljene.

Otopina jodoacetamida(IAA)

50 M otopina se priprema otapanjem 0.0046 g IAA u 0.5 mL4.1.6. Otopine za kondicioniranje kolone i eluciju peptida s kolone

Pripremi pufer

Pripremni pufer se sastoji od 25 mL acetonitrila, 25 mL MQ vode i 50 µl TFA

Ekvibracijski pufer

Pufer se priprema dodatkom 50 mL Q vode i 50 µL TFA

Otopina za eluciju peptida s kolone

Otopina se priprema s 35 mL acetonitrila, 15 mL Q vode i 50 µL TFA

3.1.7. Računalni programi za analizu podataka

- Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME 1.9.1)
- Microsoft Office 2010, Microsoft, Sjedinjene Američke Države
- Mass Lynx software verzija 4.1. SCN902,
- Waters, Milford, MA, SAD
- Protein Lynx Global Server verzija, PLGS, v. 3.0.1, Waters, Milford, MA, SAD
- Program za detekciju vrsta razvijen u Kabinetu za Bioinformatiku pisan u programsku jeziku Python, verzija 2.7.
- Protein Reader software za spektrometriju masa razvijen u Kabinetu za Bioinformatiku, pisan u programskom jeziku Java
- Vizualizacijski alat Krona

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija taloga (bakterija) iz smrznutog uzorka humanog fecesa

Izolacija bakterija i ekstrakcija proteina je provedena prema protokolu koji je opisan u radu Wisniewski i sur., 2009 (FASP II). 50 μ l homogeniziranog uzorka fecesa dodano je u 950 μ l PBS pufera u mikroperuveti od 1.5 mL u 10 paralela (radi prikupljanja biomase za daljnje korake). Uzorci su stavljeni na termomiješalicu 20 minuta, 10°C pri 1000 rpm te zatim centrifugirani pri 500 rcf, 5 min, na 10°C. 750 μ L supernatanta je prebačeno u čiste mikroepruvete od 1.5 mL te je dodano 750 μ l PBS pufera. Na talog je dodano 750 μ L pufera, mikroepruveta s uzorkom se homogenizira na vorteksu i stavlja na termomiješalicu (parametri prethodno navedeni) te se centrifugira pri 500 rcf, 5 min, 10 °C. Supernatant koji je prebačen u mikroepruvetu od 1.5 mL se centrifugira 5 min, 16 000 rcf, 10 °C, nakon centrifugiranja supernatant se baca a na talog se dodaje 750 μ L pufera. U istu mikroepruvetu se dodaje 750 μ l supernatanta nakon centrifugiranja taloga. Taj postupak se ponavlja 5 puta radi ispiranje taloga i prikupljanja veće količine bakterijske biomase. Iz 10 mikroepruveta s talogom u kojem se nalazi biomasa je izvađen supernatant, na taloge je dodan ABC pufer, homogenizirano je pipetmanom i preneseno u 5 mikroepruveta. Mikroepruvete su centrifugirane 5 min, 500 rcf kako bi se uklonile zaostale nečistoće. Supernatant se vadi i prebacuje u čiste mikroepruvete od 1.5 mL te se one centrifugiraju pri 16 000 rcf, 5 min, 10 °C (spojene 2 po 2 mikroepruvete te je dobiveno 5 mikroepruveta s koncentriranom biomasom). Supernatant se baca a talog se zamrzava.

3.2.2. Razbijanje stanica i izolacija proteina

Korišteno je sedam različitih pristupa izolacije proteina u kojima je variralo korištenje ultrazvuka, veličina filtera i detergent koji su prikazani u tablici 2. Na zamrznuti talog se dodaje 200 μ L B-PER-a. Uzorci se drže 15 min na sobnoj temperaturi te se vorteksiraju svakih 5 min. Stanice se ovisno o uzorku razbijaju sonifikatorom, parametri su podešeni na sljedeći način: $t = 5 \times 1$ min, puls = 0.5 s, P=50%. Nakon sonifikacije uzorci se stavljaju u vodenu kupelj na 100 °C, 3 min. Zatim se centrifugiraju 15 min, 16 000 rcf, 10 °C.

Tablica 2: Prikaz korištenih metoda izolacije proteina provedenih na uzorcima D1-D7

BR	OZNAKA	AMIKON	DETERGENT	ULTRAZVUK
1	D1	30 kDa	2% SDS	NE
2	D2	30 kDa	2% SDS	DA
3	D3	30 kDa	4% SDS	NE
4	D4	30 kDa	4% SDS	DA
5	D5	10 kDa	2% SDS	DA
6	D6	10 kDa	4% SDS	DA
7	D7	30 kDa	B-PER	DA

3.2.3. Pročišćavanje i digestija proteina FASP metodom

Filteri sadrže glicerol kako ne bi došlo do sušenja te se prije uporabe moraju isprati dodatkom 200 µl MQ vode i centrifugiranjem 15 min, 16 000 rcf, 15°C. Zatim se na filter dodaje 60 µL supernatanta tj. proteina u B-PER-u i 200 µL UA otopine. Filteri se postavljaju na odgovarajuće mikroepruvete i centrifugiraju pri 14 000 rcf, 15 min, 10 °C. Na filtere se dodaje 200 µl UA otopine te se ponovno centrifugira pri 14 000 rcf, 10 min, 15 °C. Ispiranje s UA se vrši 5 puta. Nakon 5. ispiranja na filter se dodaje 100 µl DTT-a te se inkubira 30 min na 25 °C. Centrifugira se 10 min, 10 000 rcf, 15 °C. Na filter se dodaje 100 µl IAA i inkubira se 20 min u mraku pri 25°C. Centrifugira se 10 min, 10 000 rcf, 15 °C. Dodaje se 100 µl UA za ispiranje te se centrifugira 10 min, 14 000 rcf, 15°C. Ispiranje se vrši 2 puta. Filter se potom ispire 3 puta dodatkom 100 µl 50 mM ABC pufera i centrifugiranje 10 min, pri 14 000 rcf, 15 °C. Mikroepruveta ispod filtera se zamijeni čistom te se na filter dodaje 75 µl 25 mM ABC pufera. Zatim se dodaje 2 µl tripsina i uzorak se vorteksira. Mikroepruvete se dobro omotaju parafilmom i uzorci se inkubiraju na termomiješalici na 37 °C, pri 400 rpm, 16 sati.

3.2.4. Pročišćavanje peptida

Uzorci su skinuti s termomiješalice i spinovani na par sekundi te zatim osušeni na 36°C. Na mikrotitarsku pločicu u jažice je dodano 60 µl uzorka i 65 µl 0,1 %-tna TFA. Pločica je postavljena u instrument AssayMap zajedno s plastičnim nosačima (12 Column Low Profile Polyro Reservoirs) u kojima se nalaze otopine za kondicioniranje kolone i eluciju peptida s kolone. Postavljena je i jedan prazan nosač predviđen za skupljanje otpada s kolone i jedan za skupljanje peptida. Trajanje programa pročišćavanja je trajalo 90 min. Kolone su prvo kondicionirane 1 puta sa 100 µL pripremnog pufera brzinom od 300 µL min⁻¹, a potom sa 100 µL ekvilibracijskog pufera brzinom od 10 µL min⁻¹. Potom je uslijedilo nanošenje uzorka (svih 60 µL) brzinom od 5 µL min⁻¹, te elucija peptida u volumenu od 30 µL brzinom od 3 µL min⁻¹. Tako dobiveni proteini suše se u vakuum centrifugi i koriste za danju analizu.

3.2.5. Analiza peptida UPLC-MS^E pristupom

Uzorak je analiziran na spektrometru masa visoke rezolucije ESI-Q-TOF Synapt G2-Si (Waters, Milford, MA, SAD) koji je bio vezan s tekućinskim kromatografom nanoACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, SAD). Instrumentalni parametri podešeni su korištenjem software-a MassLynx verzije 4.1. SCN902 (Waters, Milford, MA, SAD). Peptidi su radvojeni na analitičkoj koloni nanoAcquity UPLC 1,7 µm BEH130 C₁₈, 100 µm × 100 mm (Waters, Milford, MA, SAD) uz korištenje pretkolone UPLC 2G-V/M Trap 5 µm Symmetry C₁₈, 180 µm × 20 mm (Waters, Milford, MA, SAD). Injektirano je 1 µL uzorka. Uvjeti 75-minutnog gradijentnog ispiranja primijenjenog za optimalno razdvajanje triptičkih peptida kromatografijom obrnutih faza opisani su u Tablici 1. Pokretna faza A bila je vodena otopina mravlje kiseline (0,1%; φ), a pokretna faza B vodena otopina 0,1% mravlje kiseline i 95% acetonitrila (φ). Protok je iznosio 1 µL min⁻¹, a temperatura kolone bila je 40 °C.

Tablica 3: Uvjeti gradijenta za razdvajanje triptičkih peptida

Time (min)	% A	% B
Initial	99.0	1.0
0.10	99.0	1.0
35.0	70.0	30.0
55.0	50.0	50.0
67.0	1.0	99.0
69.0	99.0	1.0
75.0	99.0	1.0

Peptidni uzorci su prikupljeni pri niskoj i visokoj energiji MS^E pristupom. U uvjetima niske energije, podaci su prikupljeni kod konstantne kolizijske energije od 4 eV, dok je u uvjetima visoke energije kolizijska energija linearno podizana od 20 do 45 eV. Podaci su prikupljeni svake sekunde u području masa 50 – 3000 Da. Tijekom analize uzoraka korišten je stalni protok leucin-enkefalina (1 ng μL^{-1} , protok 0,4 $\mu\text{L min}^{-1}$, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 556,2771$ Da) s ciljem korigiranja točnosti masa.

3.2.6. Priprema uzorka i analiza peptida na spektrometru masa MALDI-TOF/TOF

(priprema uzorka prema protokolu Yu i sur., 2015)

Na zamrznute uzorke bakterijske biomase dodano je 200 μl USED pufera za lizu stanica te su uzorci vorteksirani i inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim su stanice razbijane ultrazvukom postavljenim na sljedeće parametre : 12 x 1 min, puls 0,5 s. nakon ultrazvuka slijedi vodena kupelj na 100 °C 3 min i centrifuga 14 000 rcf, 10 min. Supernatant se prebacuje u čistu kivetu od 1.5 mL te slijedi FASP protokol i digestija proteina tripsinom već ranije opisan u ovom radu. Nakon tripsinizacije slijedi sušenje. U Uzorak s proteinima koji će biti snimani u pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa potrebno je dodati 30 μl 5-formil-1,3-benzenedisulfoničnu kiselinu dinatrijeve soli hidrat 4-sulfofenilzotiocijanta (CAF-/CAF+ reagens). Svi uzorci se zatim vortetsiraju i stavljaju u mikrovalnu pećnicu na 8 min 180 W. Uzorci se spinuju i dodaje im

se 10% HCOOH i MQ voda. Uzorci se iz kivete prebacuju na 96 multiwell pločicu i frakcioniraju na Bravo Automated Liquid Handling Platform robotu u 2D (Nakon završetka prvog frakcioniranja a pločicu se dodaje 0,1 % TFA). Pročišćeni i osušeni peptidi se resuspendiraju u matrici, α -Ciano-4-hidroksicimetna kiselini (5 mg mL⁻¹) i nakapaju na MALDI pločicu.

Analiza peptida provodi se uz pomoć spektrometra masa MALDI-TOF/TOF u negativnom načinu rada. Za internu kalibraciju spektra masa koriste se signali peptida nastalih autolizom tripsina koji je obilježen reagensom CAF-/CAF+. Nakon snimanja spektara MS negativ, odabire se deset najintenzivnijih peptida prekursora koji se podvrgnu daljnjoj fragmentaciji u instrumentu kako bi se dobio spektar MS/MS. Spektar MS/MS odabranih peptida snima se u negativnom, a zatim u pozitivnom načinu rada instrumenta. iz dobivenih spektara iščitale su se aminokiselinske sekvencije, s kojima su se uz pomoć BLASTp identificirali proteini i organizmi u kojima se proteini nalaze. Upotrebom algoritma koji se koristi metodom poklapanja s bazom podataka, pretražuje se baza podataka svih triptičkih peptida. Za svaki MS/MS spektar određuje se po jedan triptički peptid za pojedinu taksonomsku grupu organizama.

3.2.7. Priprema uzoraka za genomiku

Za izolaciju DNA je korišten QIAamp® PowerFecal® DNA Kit prema protokolu Quick-Start. Uzorci fecesa prethodno čuvani u zamrzivaču na -80°C prvo su otopljeni na sobnoj temperaturi i homogenizirani na vorteksu. Odvagano je približno 0.25 g uzorka i prebačeno u bead beating tubice. Dodano je 750 μ l Dodano je 750 μ l Power bead otopine i 60 μ l otopine C1 te vorteksirano. Uzorci su držani u vodenoj kupelji na 65°C u trajanju od 10 minuta te vorteksirani pri brzini od 3000 rpm 30 min, a zatim centrifugirani 13 000 rcf, 1 min (zbog pokretanja i zaustavljanja postavljeno na 1.5 minutu). 400-500 μ l supernatanta se prebacuje u čistu mikrokivetu od 2 mL i dodaje se 250 μ l otopine C2. Uzorci se inkubiraju u hladnjaku 5 min na približno 4°C i centrifugiraju 13 000 rcf, 1 min. 600 μ l supernatanta se prebacuje u čistu kivetu od 2 mL i dodaje se 200 μ l otopine C3, kratko homogenizira te drži 5 min na 4°C. Supernatant se prebacuje u čistu kivetu od 2 mL (ne uzeti više od 750 μ l), dodaje se 1200 μ l otopine C4 i vorteksira se barem 5 s. Zatim se volumen od 650 μ l supernatanta se prenosi na MB spin kolonu i centrifugira 13 000 rcf, 1 min (postupak se ponavlja 3 puta). Dodaje se 500 μ l otopine C5 i centrifugira 13 000 rcf, 1 min, a dobiveni permeat se baca te se

kiveta s filterom ponovo centrifugira pri 13 000 rcf, 1.5 min. MB spin kolona se postavlja na čistu kivetu od 2 mL, ostatak se baca. Dodaje se 60 ili 100 µl otopine C6 na centar membrane na koloni za eluaciju DNA i centrifuga 13 000 rcf, 1 min. Uzorci se sakupljaju u tubici na koju je postavljena MB spin kolona.

3.2.8. Određivanje koncentracije DNA

Za određivanje koncentracije DNA na leću Nano-drop spektrofotometra nanosi se 2 µl uzorka. Mjerenje se pokreće u BioSpec programu, a kao rezultat dobivaju se apsorbancije (OD 230, 260 i 280) i izmjerena koncentracija DNA u uzorku. Prije samog mjerenja potrebno je postaviti slijepu probu ovisno o korištenom puferu za eluaciju.

Omjeri apsorbancije pri 260 nm i 280 nm odnose se na kvalitetu DNA i RNA. Za DNA omjer 260/280 je od 1,7-1,9, a za RNA vrijedi omjer oko 2.0. Ako je omjer manji to ukazuje na prisutnost proteina, fenola ili drugih kontaminanata.

Kao dodatni kriterij koristi se omjer 260/230, a vrijednosti su u rasponu od 2,0-2,2. Ako je omjer manji moguća je kontaminacija spojevima kao što su EDTA, ugljikohidrati i fenoli.

3.2.8. Sekvencioniranje 16S rRNA marker gena

Sekvencioniranje DNA izvršeno je kao vanjska usluga u Molecular Research Lab, Teksas, SAD. Korištena je metoda sekvencioniranja sparenih krajeva (pair-end sequencing) na Illumina MiSeq uređaju. Korištene su početnice 341F-806R za umnažanje V3 i V4 regija gena koji kodira za 16S rRNA korištenjem polimerazne lančane reakcije (PCR) u 30 ciklusa. Nakon umnažanja fragmenta gena PCR produkti su provjereni na 2%-om agaroznom gelu te su pročišćeni korištenjem kalibriranih Ampure XP kuglica. Pročišćeni PCR produkti su korišteni za izradu DNA knjižnica upotrebom Illumina TruSeq DNA library protokola te zatim sekvencionirani Illumina MiSeq platformom.

3.2.10. Bioinformatička analiza MS/MS spektara metodom baziranom na LSI

Vrste i sojevi mikroorganizma koji se nalaze u fecesu su detektirani koristeći tandemnu masenu spektrometriju u kombinaciji s inovativnim sustavom razvijenim na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu, u kabinetu z Bioinformatiku. Aminokiselinski slijed u peptidima je detektiran analizom peptidnog otiska prsta. S obzirom na konstantan porast proteinskih baza podataka postoje poteškoće u procesu sparivanja i usporedbe podataka s ciljem identifikacije proteina i mikroorganizma iz kojeg potječe. U kabinetu za Bioinformatiku na PBF-u ovaj problem je riješen prilagođavanjem LSI metode za analizu mikrobnog proteoma. LSI (engl. Latent Semantic Indexing) je prvobitno dizajniran kako bi se prevladao problem tijekom sparivanja riječi upita s riječima dokumenta. Prilagođena metoda identificira mikroorganizme u fecesu pomoću iščitanih fragmenata proteoma koji su dobiveni MS/MS analizom. To je omogućeno zato što su proteomi prikazani kao tekstualni podaci, tj. pronađena je prikladna funkcija koja može translirati proteinsku sekvencu u riječ i prikazati je kao kolekciju tripeptida. Metodom translacije jedan protein daje tri znakovna slijeda koja se spajaju u jedinstvenu rečenicu. Postupak je razrađen tako da je uzeta NCBI nr baza koja sadrži više od 145 mil. Proteinskih sekvenci te je vektorizirana.

3.2.11. Obrada podataka sekvencioniranja

Sirovi podaci sekvencioniranja fragmenta gena 16S rRNA dolaze u dva dokumenta u FASTQ formatu koji sadržavaju podatke o očitanoj slijedu nukleotida i o kvaliteti očitavanja svakog pojedinog nukleotida. Svaki dokument odgovara jednom smjeru čitanja DNA i da bi dobili ukupni umnoženi fragment potrebno je dva očitavanja (eng. read) spojiti. Za spajanje korišten je program PandaSeq sa standardnim postavkama i s očekivanom dužinom spojenih sljedova od 400 do 500 nukleotida. Spojeni sljedovi su služili kao ulazni podaci za programski paket QIIME. Svaki je slijed dodijeljen odgovarajućem uzorku na osnovu očitanoj barkoda koji se nalazi na početku svakog slijeda. Sljedovi kojima prvih 8 nukleotida nije u potpunosti odgovaralo jednom od korištenih barkodova su odbačeni iz daljnjih analiza. Sljedovi svakog uzorka su klasterirani u operacijske taksonomske jedinice (OTU) sa minimalnom pokrivenošću od 97% i minimalnom identičnošću od 97% korištenjem

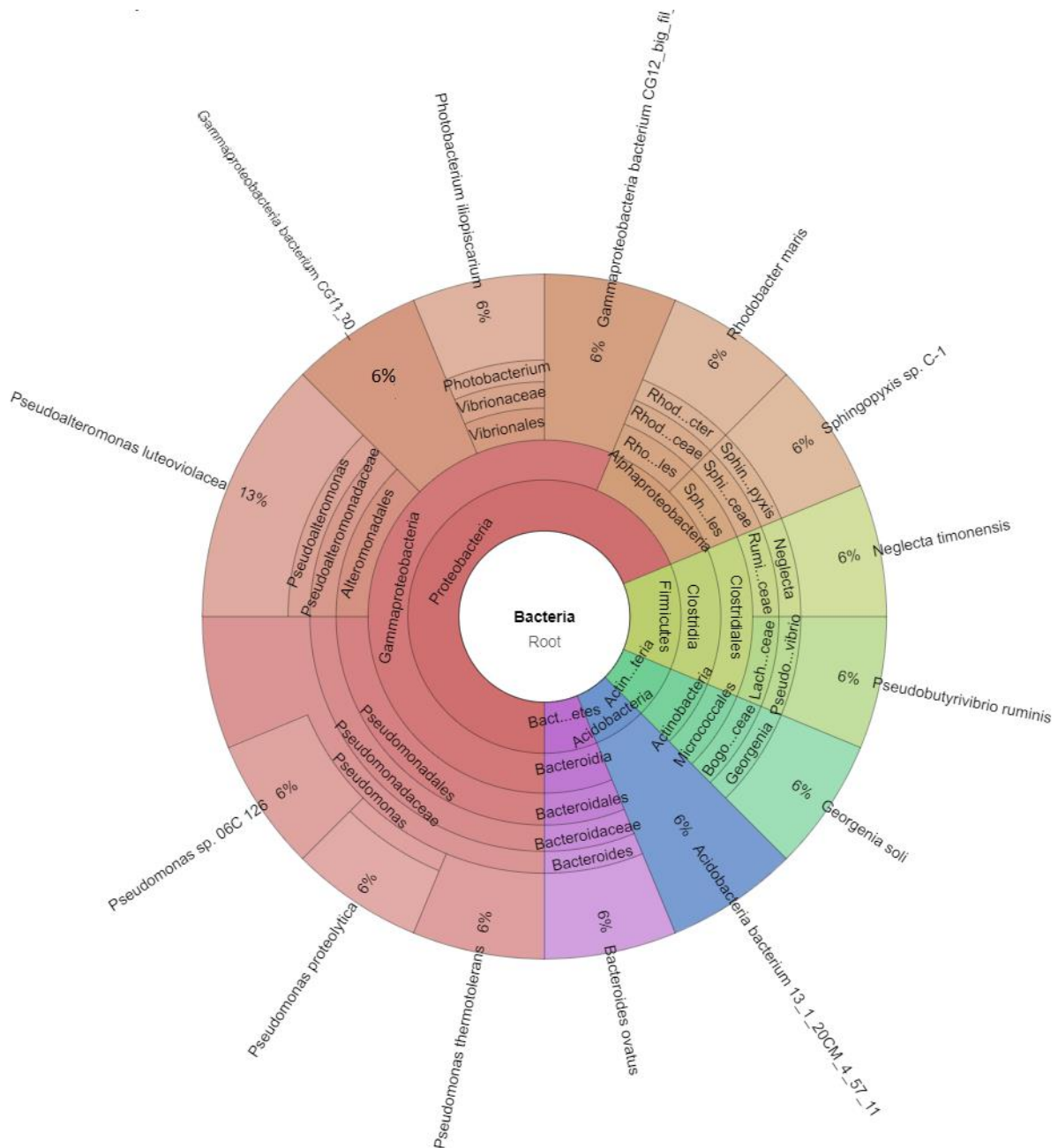
UCLUST algoritma implementiranog u QIIME programskom paketu. Reprezentativni slijed svakog klastera je poravnat sa SILVA taksonomskom bazom korištenjem pynast algoritma.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati analize UPLC–ESI-Q-TOF spektrometrom masa i bioinformatičke analize novorazvijenom metodom baziranom na LSI

Analizom uzorka masenim spektrometrom UPLC–ESI-Q-TOF dobiveni su MS2 spektari čiji intenziteti pokazuju relevantnost pojedinog spektra, na temelju kojih je određen slijed aminokiselina. Pretraga je provedena korištenjem Genbank nr baze podataka (engl. non redundant) koja sadrži proteolitičke produkte tripsina. Nadalje, pretragom interne baze podataka dohvaćene su taksonomske grupe peptida kojima ti sljedovi aminokiselina pripadaju.

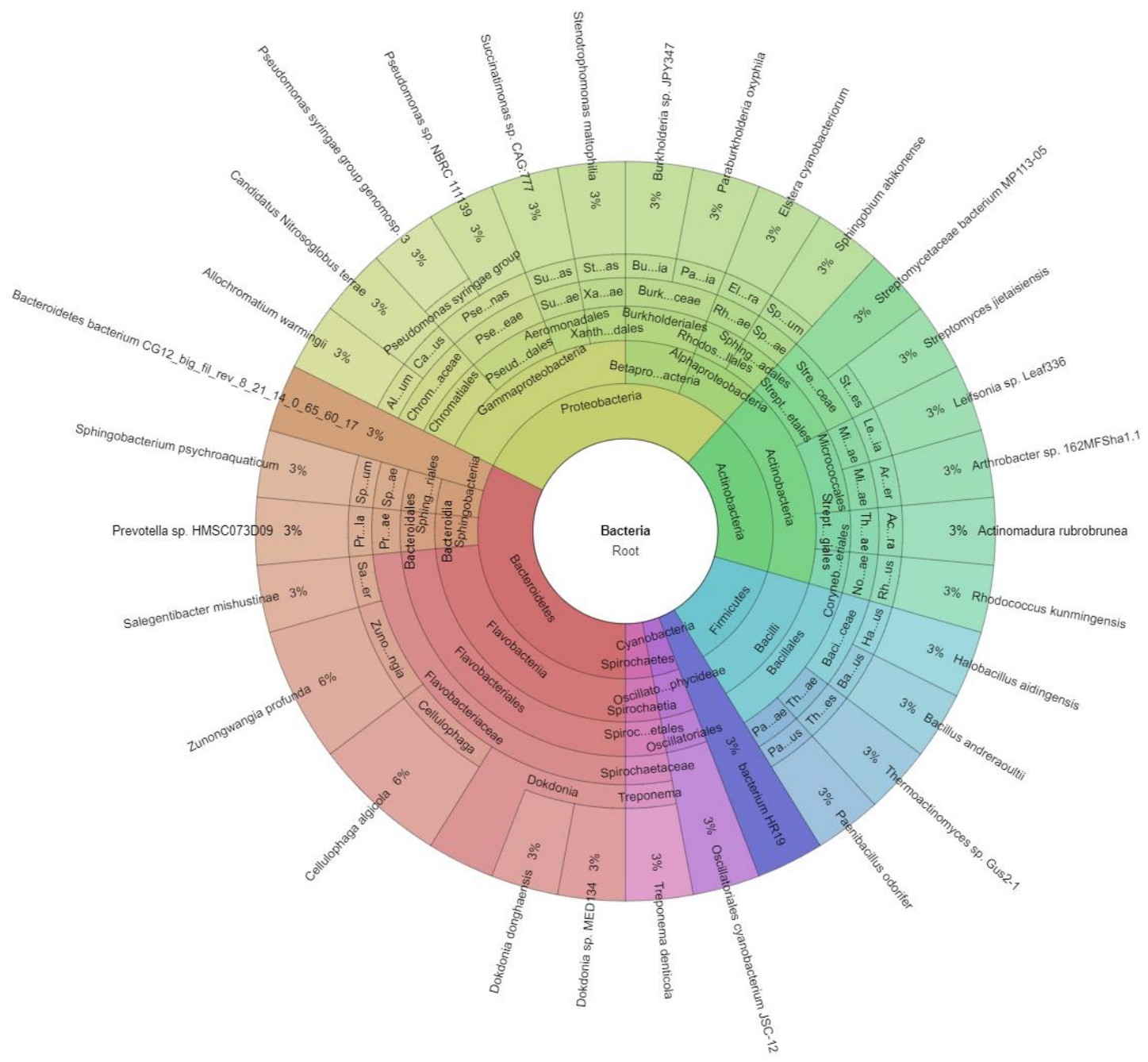
Za pripremu uzoraka je korišteno sedam različitih postupaka izolacije proteina (Tablica 2, materijali i metode), u kojima je kombinirana primjena ultrazvučnog homogenizatora, dvije veličine cut-off filtera i SDS detergenta. Rezultati taksomske analize uzoraka su prikazani slikama 1.-7., a identificirani proteini navedeni su u prilogima (Prilog 1).



Slika 5: Taksonomski prikaz zastupljenosti mikroorganizama na nivou vrste u uzorku D1. Kružni graf načinjen je pomoću alata Krona

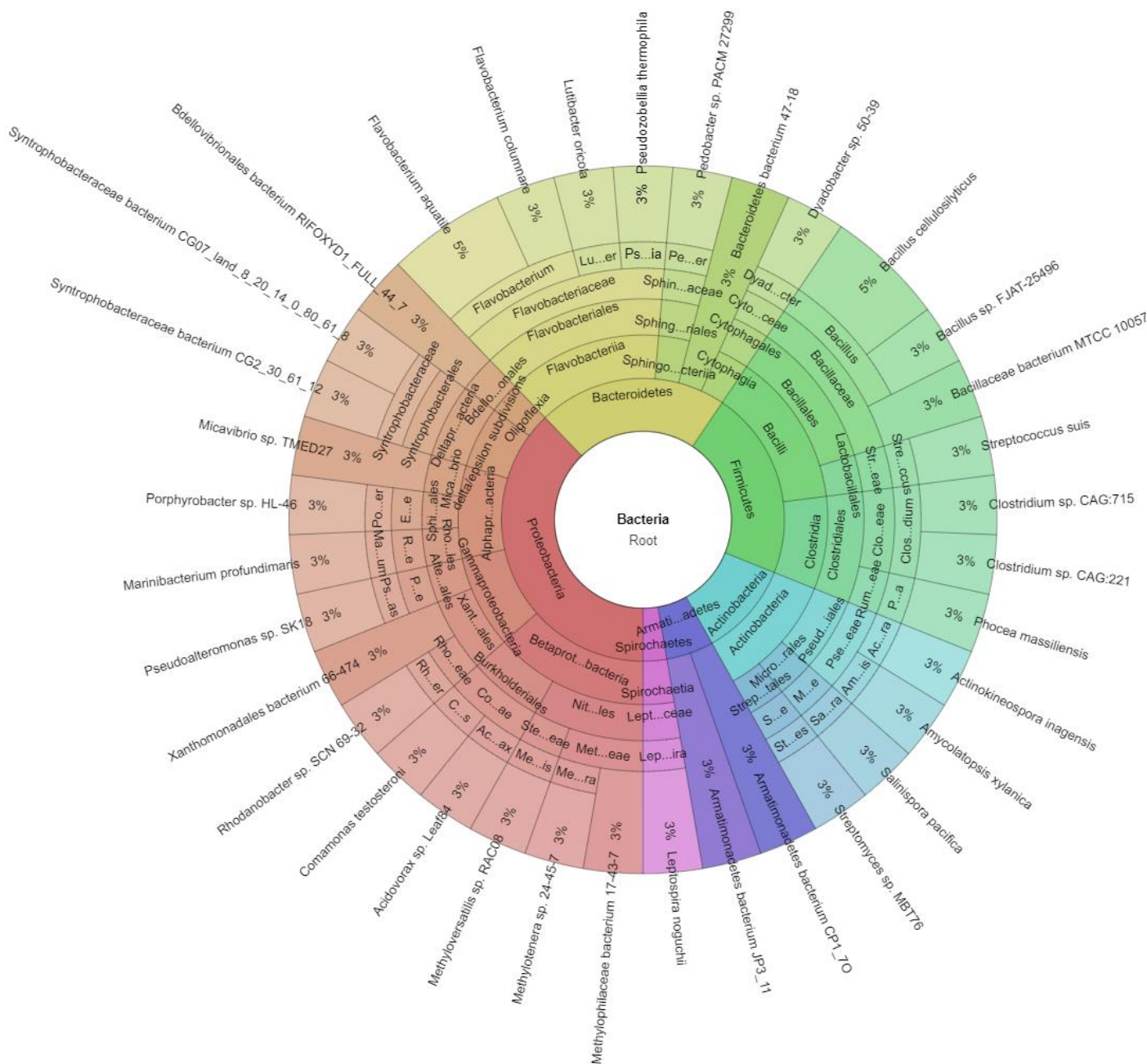
Analizom uzorka D1 je identificirano 14 bakterija među kojima su zastupljena 4 koljena: *Proteobacteria* (69%), *Firmicutes* (13%), *Bacteroidetes* (6%) i *Actinobacteria* (6%). Najzastupljenija bakterija koja pripada koljenu *Proteobacteria* je *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, prvotno izolirana iz morske vode (Gauthier i dr., 1982). Nadalje, identificirane su i vrste *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas proteolytica* i *Pseudomonas thermotolerans*. Bakterija roda *Pseudomonas* pokazuje dobru metaboličku raznolikost i stoga ima mogućnost

kolonizirati velik broj staništa uključujući i debelo crijevo (Madigan i dr., 2005). Identificirane bakterije koje pripadaju koljenu *Frimicutes* su *Neglecta timonensis*, koja je izolirana iz fecesa starije ženske osobe s dijabetesom tipa 2 (Bessis i dr., 2016) i *Pseudobutyrvibrio ruminis*, bakterija za koju je dokazano da doprinosi fermentaciji ugljikohidrata u buragu ruminalnih životinja (van Gylswyk i dr., 1996). *Bacteroides ovatus* je bakterija identificirana iz koljena Bacteroidetes koja je sastavni dio crijevne mikrobiote u pacijenata s upalnim bolestima crijeva, a uzrokuje sistemni upalni odgovor (Saitoh i dr., 2002).



Slika 6: Taksonomski prikaz zastupljenosti mikroorganizama na nivou vrste u uzorku D2. Kružni graf načinjen je pomoću alata Krona

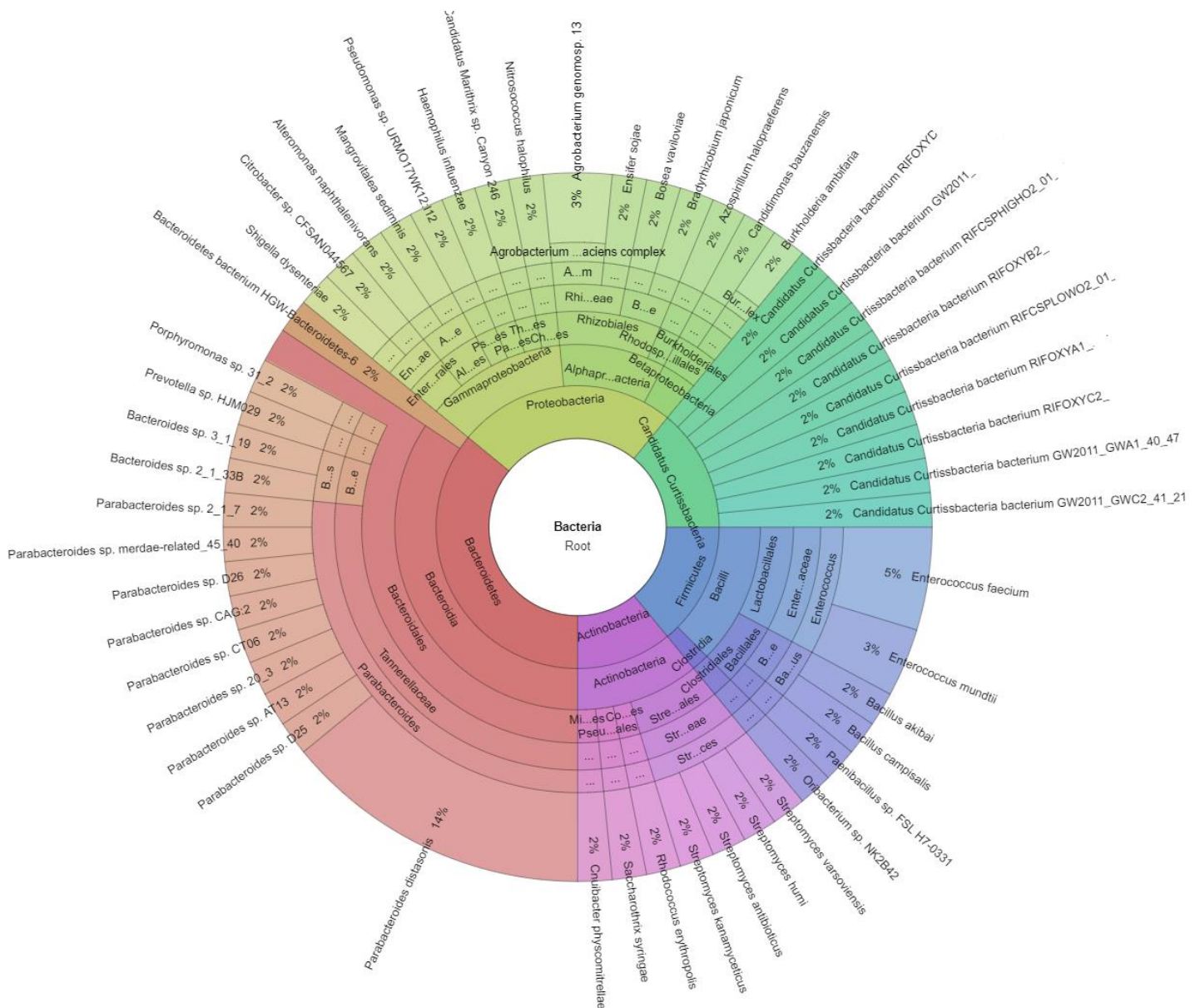
U uzorku D2 su identificirane 34 bakterijske vrste koje prema taksonomskoj podjeli pripadaju koljenu Bacteroidetes (32%), Proteobacteria (29%), Actinobacteria (18%) i Firmicutes (12%). Od bakterija koje spadaju u sastavni dio crijevne mikrobiote na Slici 2 se nalaze *Prevotella* (3%), bakterija koja dominira u čovjeku čija dijeta obiluje ugljikohidratima (Wu i dr., 2011), zatim *Pseudomonas* sp. (3%), *Succinatimonas* sp. (3%), striktni anaerob izoliran iz humnog fecesa (Morotomi i dr., 2010) i *Bacillus andreraoultii* (3%).



Slika 7: Taksonomski prikaz zastupljenosti mikroorganizama na nivou vrste u uzorku D3. Kružni graf načinjen je pomoću alata Krona

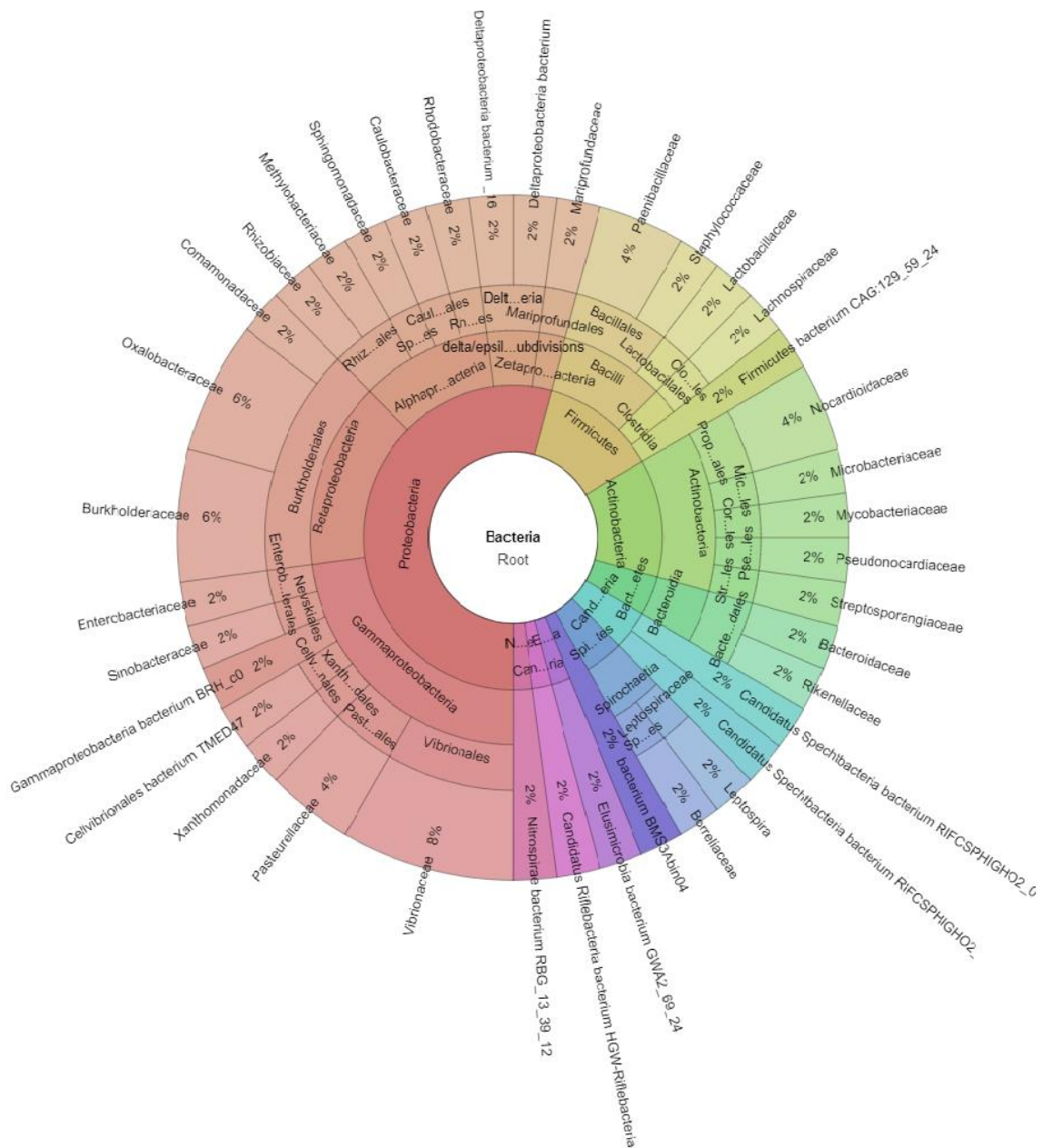
U uzorku D3 (Slika 7.) je identificirano 37 bakterija koje pripadaju koljenu *Bacteroidetes* (22%), *Proteobacteria* (38%), *Actinobacteria* (11%), *Firmicutes* (22%) i *Armatimonadetes* (5%). Iz razreda *Betaproteobacteria*, koji čini 36% koljena *Proteobacteria*, identificirane su bakterijske vrste *Methyloversatilis* sp., *Methylotenera* sp., i *Methylophilaceae* sp. Navedene bakterije izolirane su iz kopnenih voda, aktivnog mulja i biljaka, a specifične su

jer koriste metanol i metionin kao izvor energije (Doronina i dr., 2014). U koljeno *Bacteroidetes* spadaju četiri identificirane bakterije razreda *Flavobacteriaceae* te vrste *Pedobacter sp.* i *Dyadobacter sp.* za koje je ustanovljeno da su česti kontaminanti u laboratorijskim kitovima i reagentima te stoga mogu imati utjecaj na rezultate metaproteomike kod uzoraka s niskom koncentracijom bakterijske biomase (Salter i dr., 2014). U koljenu *Firmicutes* identificirane su bakterije razreda *Bacilli* (14%) i *Clostridiales* (8%).



Slika 8: Taksonomski prikaz zastupljenosti mikroorganizama na nivou vrste u uzorku D4. Kružni graf načinjen je pomoću alata Krona

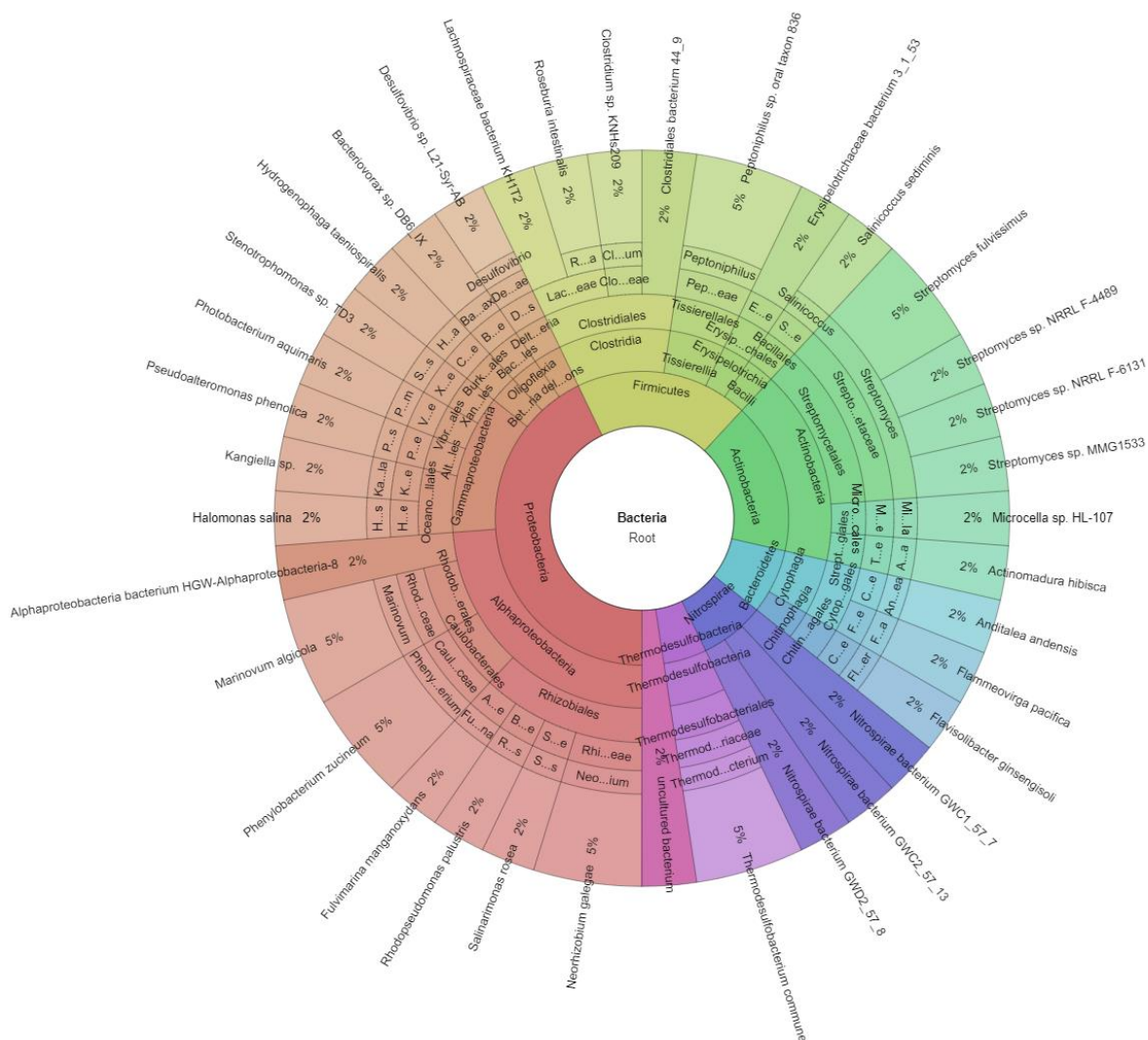
Najzastupljenije identificirano koljenu u uzorku D4 je *Bacteroidetes* (36%) u kojem rod *Parabacteroides* čini 27% ukupno identificiranih bakterija, a vrsta *Parabacteroides distasonis* 14%. *P. distasonis* nedostaje u crijevnoj mikrobioti pacijenata s upalnim crijevnim bolestima čija se uloga povezuje s odgovorom na upalne bolesti crijeva (Zitomersky i dr., 2013). Od ukupnog broja 25% identificiranih bakterija pripada koljenu *Proteobacteria* u koji spadaju i patogene bakterije *Shigella dysenteriae* i *Haemophilus influenzae*. To su oportunistički patogeni koji prirodno obitavaju u crijevnoj mikrobioti domaćina te ne moraju nužno uzrokovati bolest (Baucellis i dr., 2015). Nadalje, identificirano je pet bakterija koljena *Firmicutes* (14%), a najzastupljenija su *Enterococcus faecalis*(5%) i *Enterococcus munditi* (3%). Potrebno je spomenuti da su navedene bakterije dio crijevne mikrobiote zdravog čovjeka, no mogu uzrokovati ozbiljne infekcije jer su često rezistentne na antimikrobna sredstva i neke antibiotike (Huycke i dr., 1991). Koljeno *Actinobacteria* čini 11 % identificiranih bakterija u uzorku D4.



Slika 9: Taksonomski prikaz zastupljenosti mikroorganizama na nivou vrste u uzorku D5. Kružni graf načinjen je pomoću alata Krona

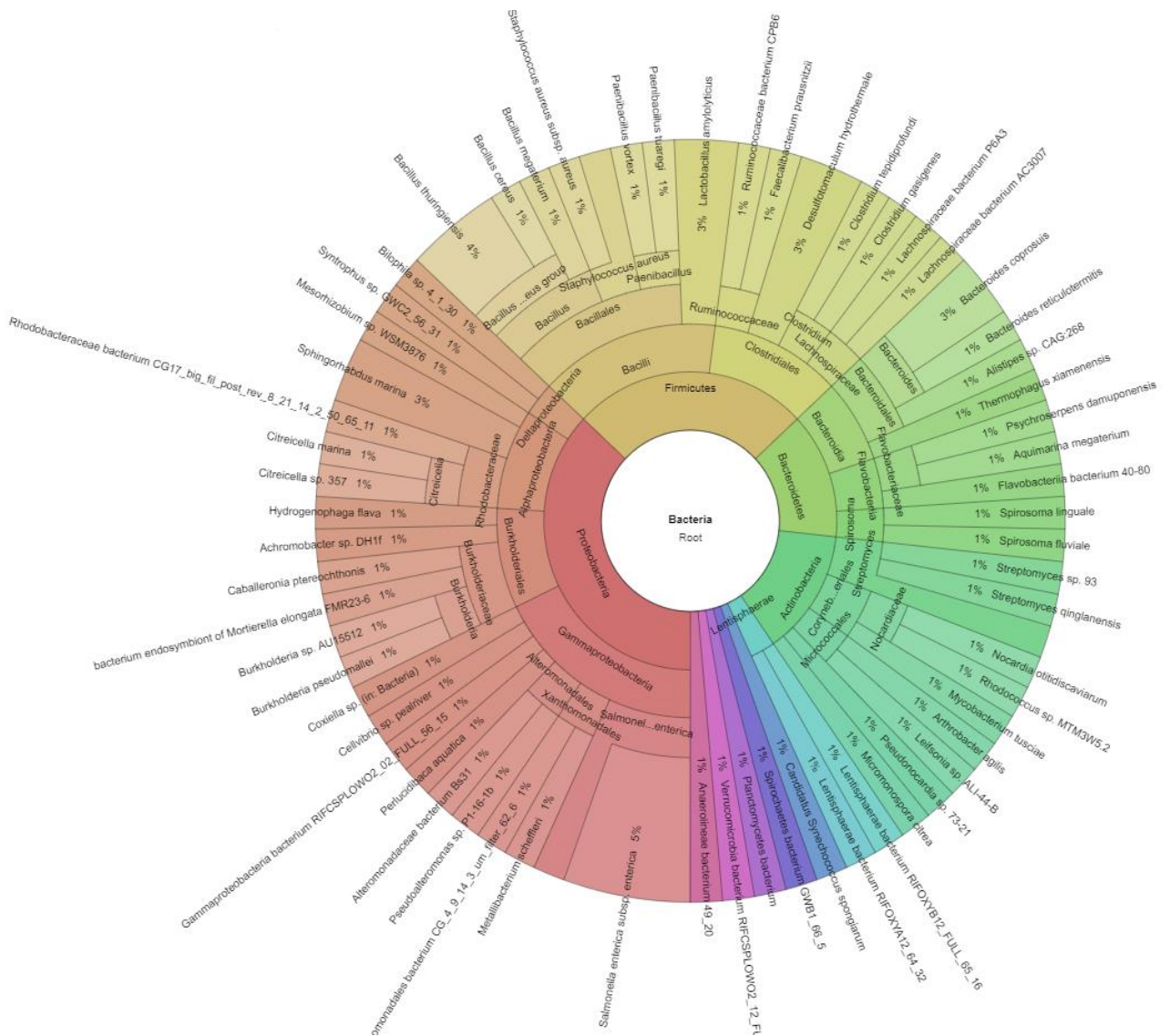
u uzorku D5 (Slika 9.) najzastupljenije koljeno je *Proteobacteria* (54%) ,a vidi se da prevladavaju razredi Gammaproteobacteria (23%), Betaproteobacteria (15%) i Alphaproteobacteria (10%). U koljenu Firmicutes (13%) identificirane su porodice *Paenobacillus* (4%), *Staphylococcae* (2%), *Lactobacillaceae* (2%), *Lahnospiraceae* (2%). Koljeno *Actinobacteria* čini 11% ukupnih bakterija u uzorku. U koljenu Bacteroidetes (4%) dominiraju porodice *Bacteroidaceae* (2%) i *Rikenellaceae* (2%) koje su karakteristične za

crijevnu mikrobiotu, a broj im se smanjuje kod dijeta bogatih masnoćom te kod pretilih osoba (Thomas i dr., 2011).



Slika 10: Taksonomski prikaz zastupljenosti mikroorganizama na nivou vrste u uzorku D6. Kružni graf načinjen je pomoću alata Krona

Na Slici 6. su dani rezultati analize uzorka D6, prema kojima 48 bakterija pripada koljenu koljenu *Proteobacteria* (43%), *Firmicutes* (19%), *Bacteroidetes* (5%) i *Actinobacteria* (17%) i *Nitrospira* (7%). Bakterija *Erysipelotrichaceae bacterium* iz koljena *Firmicutes* postiže višu koncentraciju u gastrointestinalnom sustavu kod osoba oboljelih od raka debelog crijeva te kod Chronove bolesti (Kaakoush i dr., 2015). Bakterije iz koljena *Nitrospira* koloniziraju staništa poput otpadnih voda, pročišćivača otpadnih voda, tla. One imaju bitnu ulogu u dušikovom ciklusu, međutim teško ih je kultivirati u laboratorijskim uvjetima (Pester i dr., 2014).



Slika 11 : Taksonomski prikaz zastupljenosti mikroorganizama na nivou vrste u uzorku D7. Kružni graf načinjen je pomoću alata Krona

Iz Slike 11. je vidljivo da su u uzorku identificirane bakterije koljena *Proteobacteria* (37%), *Firmicutes* (26%), *Bacteroidetes* (14%) i *Actinobacteria* (14%). Prema literaturnim podacima u crijevnoj mikrobioti osoba starije životne dobi prevladava koljeno *Bacteroidetes* (57%) iza kojeg slijedi koljeno *Firmicutes* (40%) te u manjem postotku *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Verucomicobia*. Isto tako zna se da u crijevnoj mikrobioti mlađih osoba prevladava koljeno *Firmicutes* (Claesson i sur., 2011). Istraživanja su pokazala da ako u uzorku prevladava koljeno *Proteobacteria* da to ukazuje na disbiozu crijevne mikrobiote gdje ima ulogu u upalnim bolestima gastrointestinalnog sustava (Zilber-Rosenberg i Rosenberg, 2008). U uzorku je pristuan patogeni mikroorganizam *Salmonella enterica* koji koji ne

obitava u zdravom čovjeku (Verberkmoes i dr., 2008). Po zastupljenosti slijedi koljeno *Firmicutes* s redovima *Bacillales* (12%), *Lactobacillales* (3%) i *Clostridiales*(11%), a kod njih su *Bacillus thuringensis* (4%) i *Lactobacillus amylolyticus* (3%) najzastupljenije vrste. Iz navedenog može se zaključiti da sonifikacija povećava udio bakterija koljena *Firmicutes* dok smanjuje broj bakterija koljena *Bacteroides* i *Actionobacteria* (Zhang i sur., 2017).

Tablica 5: Rezultati analize dobiveni spektrometrom masa ESI-Q-TOF i obrade podataka bioinformatičkim alatom temeljenim na LSI

broj	oznaka	broj vrsta	broj bakterija	udio bakterija u vrstama (%)	broj identificiranih peptida
1	D1	35	16	45.71	30
2	D2	54	34	62.96	48
3	D3	53	37	69.81	48
4	D4	80	64	80.00	48
5	D5	74	48	64.86	65
6	D6	63	42	66.67	60
7	D7	97	73	75.26	83

Tablica 5 sadrži ukupan broj identificiranih mikroorganizama, udio bakterija i ukupan broj identificiranih peptida u pojedinom uzorku. Najveći broj peptida (83) i bakterijskih vrsta (73) je identificirano u uzorku D7. U izolaciji proteina iz bakterijske biomase uzorka D7 je primjenjena sonifikacija, komercijalni neionski detergent B-PER i Amicon 30 kDA cut-off filter za pročišćavanje proteina. Kod uzorka D4 gdje je korišten ionski detergent 4% SDS i sonifikacija je identificirano 48 peptida i 64 bakterijskih vrsta. U fecesu se nalazi velika količina Gram pozitivnih bakterija poput bakterija koljena *Firmicutes* i *Actinobacteria*. Zbog debelog sloja peptidoglikana u njihovoj staničnoj stijenci sonifikacija ili neka druga mehanička disrupcija te odgovarajući lizirajući pufer su nužni za učinkovitu analizu (Tanca i dr., 2014). Najmanje peptida i bakterijskih vrsta je identificirano u uzorku D1. U izolaciji proteina iz uzorka D1 je korišten 2% SDS i nije primjenjena sonifikacija što je vjerojatno dovelo do niske koncentracije proteina i neučinkovite analize. Posebno je niska koncentracija Gram pozitivnih bakterija iz koljena *Firmicutes* i *Actinobacteria*. U uzorcima D5 i D6 je

smanjen broj koljena Bacteroidetes koja čini 5% od ukupno identificiranih bakterija. U pripremi su korišteni Amico 10 kDA cut-off filteri i sonifikacija za koju je dokazano da smanjuje identifikaciju koljena Bacteroidetes (Zhang i dr., 2017).

4.2. Rezultati analize peptida spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF

4.2.1. Bioinformatička analiza metodom baziranom na LSI

Nakon snimanja spektara masa u negativnom načinu rada odabrano je 10 najintenzivnijih signala iz spektra koji se podvrgnu daljnjoj fragmentaciji u instrumentu. Produkt daljnje fragmentacije je MS/MS spektar masa koji se snima u pozitivnom načinu rada. Analiza peptida se razlikuje u ionizaciji i detekciji iona, no analiza masenih spektara ovim pristupom jednaka je gore opisanoj UPLC-MS^E analizi. Razlikovni proteini iz uzorka fecesa koji su identificirani se nalaze u prilogima (Prilog 2).

U analizi je korišten uzorak fecesa podijeljen u dvije paralele koje se nisu razlikovale u načinu pripreme. Broj identificiranih proteina se nalazi u Tablici 6. Iz tablice je vidljivo da je broj identificiranih i hipotetskih proteina približno jednak za oba uzorka što je u skladu s očekivanjima s obzirom da je riječ o istom uzorku.

Tablica 6: Broj identificiranih proteina dobivenih spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF i bioinformatičkim alatom temeljen na LSI

analiza	Broj identificiranih neredundantnih proteina	Broj redundantnih identificiranih proteina	Broj hipotetskih proteina
Analiza 1	14	462	3
Analiza 2	15	641	3

U Tablicama 7 i 8 je prikazana taksonomska podjela uzorka na razini vrste koja je provedena pretraživanjem NCBI nr baze podataka alatom BLAST te aminokiselinski slijed prema kojem je identificirana vrsta. Prema rezultatima iz Tablice 7 i 8 je vidljivo da najveću vjerojatnost pristupstva MS fragmenta u analizi 1 i analizi 2 imaju proteini čovjeka, konkretno keratina tipa II. Keratin je strukturni protein koje se nalazi na koži, u kosi i noktima, te je kontaminacija u proteomici učestala ukoliko se ne koristi laminar (Hodge I dr., 2013). Identificirane vrste zajedničke analizi 1 i analizi 2 su *Homo sapiens* i *Mesorhizobium sp.*, a porodici *Ruminococcaceae* pripadaju *Faecalibacterium prausnitzii* iz analize 1 i nekultivirani *Ruminococcus* iz analize 2.

U tablici 7 su identificirani i *Mesorhizobium sp.* i *Rhizobium sophoriradicis*, bakterije koljena *Actinobacteria* koje inače nalazimo u tlu, no koje se nalaze i u humanom fecesu (Andoh i dr., 2012). Porodica *Rhizobiceae* identificirana je i u uzorcima D5, D6 i D7, a rod *Mesorhizobium* u uzorku D7. Identificirane su bakterije roda *Ruminococcus sp.* te *Clostridium leptum* i *Blautia sp.* koje su sastavni dio mikrobiote zdravog čovjeka. Bakterije roda *Ruminococcus* su identificirane u uzorku D7 na razini roda i u uzorku D3 na razini porodice. Rod *Clostridium* je nađen u uzorcima D3, D6 i D7.

U tablici 8 je vidljivo da je s najvećom sigurnošću identificirana bakterijska vrsta *Faecalibacterium prausnitzii*. Spomenuta vrsta ima visoku ekspresiju gena te je u prijašnjem istraživanju analize 16 s rRNA gena doprinosila sveukupnoj mikrobnj zajednici s oko 5%, dok u metaproteomici sa 10% (Kolmedar i sur., 2012). *F. prausnitzii* je pomoću ESI-Q-TOF identificirana u uzorku D7. Nađene su i bakterija *Pseudobutyrvibrio ruminis* koja ima ulogu u proizvodnji butirata u gastrointestinalnom sustavu (van Glyswyk i dr., 1996) nađena je u uzorku D1. *Christensenella timonensis*, *Anaeromassilibacillus sp. An200*, *Halomonas sp. KM-1* i *Gulosibacter molinativorax* nisu detektirane iz uzoraka analiziranih na spektrometru masa ESI-Q-TOF. Identificirane bakterije pripadaju uglavnom koljenu *Firmicutes* i *Proteobacteria*, dok bakterije koljena *Bacteroidetes* nisu identificirane ovom metodom.

Identificirani su i eukarioti *Sorghum bicolor*, žitarica koja se uzgaja za stočnu hranu (Paeterson i dr., 2012) i *Penicillium steckii*, plijesan koja se također nalazi u hrani.

Tablica 7 : Prikaz identificiranih vrsta iz analize 1 dobivenih spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF i bioinformatičkim alatom razvijenim na PBF-u

NCBI taksnomski ID	Ime vrste	Vjerojatnost prisustva	MS fragment	Carstvo/koljeno/Razred/red/porodica
9606	<i>Homo sapiens</i>	12.62%	LENEIQTYR, HGNSHQGEPR, SQYEQLAEQNR, QISNLQQSISDAEQR	<i>Eukaryota</i>
1505936	<i>Mesorhizobium</i> <i>sp. ORS3428</i>	1.15%	ILELEHLLDR	<i>Bacteria /</i> <i>Proteobacteria</i> <i>/Alphaproteobacteria/</i> <i>Rhizobiales</i> <i>/Phyllobacteriaceae</i>
1535245	<i>Rhizobium</i> <i>sophoriradicis</i>	0.38%	QLDWYSKR	<i>Bacteria</i> <i>/Proteobacteria</i> <i>/Alphaproteobacteria</i> <i>Rhizobiales</i> <i>/Rhizobiaceae</i>
1742973	<i>Candidatus</i> <i>Nitrospira</i> <i>nitrificans</i>	0.38%	QAYEEIAKR	<i>Bacteria</i> <i>Nitrospirae</i> <i>Nitrospirales</i> <i>Nitrospiraceae</i>
165186	<i>uncultured</i> <i>Ruminococcus</i> <i>sp.</i>	0.38%	NYRPNAYHEGK	<i>Bacteria /</i> <i>Firmicutes</i> <i>Clostridia /</i> <i>Clostridiales</i> <i>Ruminococcaceae</i>
4558	<i>Sorghum</i> <i>bicolor</i>	0.38%	ALLSKILINYMIAGR	<i>Eukaryota</i>
1816678	<i>Christensenella</i> <i>timonensis</i>	0.19%	KAEEYIAAGR	<i>Bacteria</i> <i>Firmicutes</i> <i>Clostridia</i> <i>Clostridiales</i> <i>Christensenellaceae</i>
590061	<i>Halomonas sp.</i> <i>KM-1</i>	0.19%	SHIDRPIHR	<i>Bacteria /</i> <i>Proteobacteria /</i> <i>Gammaproteobacteria /</i> <i>Oceanospirillales /</i> <i>Halomonadaceae</i>
2035417	<i>bacterium</i> <i>HR22</i>	0.19%	SLSPEEQQLQR	<i>Bacteria</i>

Tablica 8: Prikaz identificiranih vrsta iz analize 2 dobivenih spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF i bioinformatičkim alatom razvijenim na PBF-u

NCBI taksnomski ID	Ime vrste	Vjerojatnost prisustva	MS fragment	Carstvo/koljeno/Razred/red/porodica
9606	<i>Homo sapiens</i>	6.10%	QSLEASLAETEGR, LENEIQTYR, LNDLEDALQQAK, LKYENEVALR	<i>Eukaryota</i>
853	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	3.88%	KGDTVFDTDEGPR	<i>Bacteria</i> <i>Firmicutes</i> <i>Clostridia</i> <i>Clostridiales</i> <i>Ruminococcaceae</i>
46206	<i>Pseudobutyribrio ruminis</i>	0.55%	KAAFELNGVK	<i>Bacteria</i> <i>Firmicutes</i> <i>Clostridia</i> <i>Clostridiales</i> <i>Lachnospiraceae</i>
416169	<i>Rhodanobacter thiooxydans</i>	0.28%	KFSEEIAAGR	<i>Bacteria</i> <i>Proteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i> <i>Xanthomonadales</i> <i>Rhodanobacteraceae</i>
1505936	<i>Mesorhizobium sp. ORS3428</i>	0.28%	ILELEHLLDR	<i>Bacteria</i> <i>Proteobacteria</i> <i>Alphaproteobacteria</i> <i>Rhizobiales</i> <i>Phyllobacteriaceae</i>
101127	<i>Hesseltinella vesiculosa</i>	0.14%	RLLEYNSR	<i>Eukaryota</i>
2007294	<i>Marine Group II euryarchaeote MED-G33</i>	0.14%	LDEKPPIPR	<i>Eukaryota</i>
303698	<i>Penicillium steckii</i>	0.14%	VSELAIAAIR	<i>Eukaryota</i>
134013	<i>Phytomonas sp. isolate Hart1</i>	0.14%	INKFVLSLHR	<i>Eukaryota</i>
1396141	<i>Haloferula sp. BvORR071</i>	0.14%	FLEIFRVFR	<i>Bacteria</i> <i>Verrucomicrobia</i> <i>Verrucomicrobiae</i> <i>Verrucomicrobiales</i> <i>Verrucomicrobiaceae</i>
256821	<i>Gulosibacter molinativorax</i>	0.14%	SKYEQISANVVK	<i>Bacteria</i> <i>Actinobacteria</i> <i>Micrococcales</i> <i>Microbacteriaceae</i>

4.2.2. Bioinformatička analiza na ProteinReader-u

Identifikacija istog peptida iz MS/MS- i MS/MS+ spektra iz istog prekursora se naziva „sure shot“ i značajno povećava pouzdanost rezultata. S obzirom na broj pogodjenih peptida, ProteinReader određuje vrstu koja je pristuna u NCBI Inr bazi podataka. Procesirani i prikupljeni podaci daju informacije o bakterijskoj vrsti u uzorku (Cindrić, 2013)

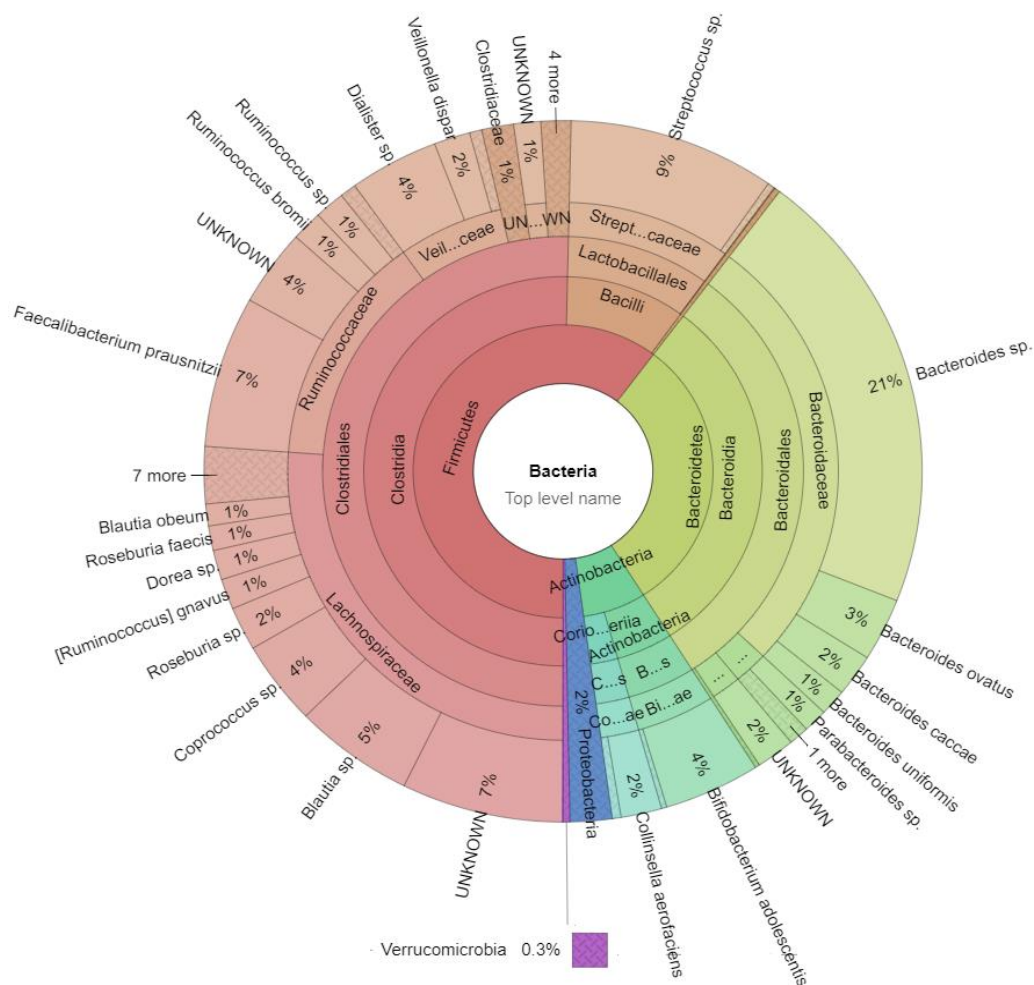
U Tablici 9 se nalaze bakterijske vrste iz uzorka fecesa rangirane prema najvišem „sure shot“ pogotku. Ovom metodom je sa sigurnošću određena bakterija *Ruminococcus sp.* koljena *Firmicutes* koja je identificirana i bioinformatičkom metodom baziranom na LSI i spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF i ESI-Q-TOF u uzorku D7. *Bacillus halodurans*, *Blautia hansenii*, bakterije koljena *Firmicutes* i *Rhodanobacter spp.*, bakterija koljena *Proteobacteria* su identificirane bioinformatičkom metodom temeljenom na LSI i na ProteinReader-u

Ovom metodom je jednoznačno određena bakterijska vrsta *Ruminococcus sp.* koja vjerojatno predstavlja najzastupljeniju vrstu u bakterijskoj biomasi uzorka fecesa. Iako se ostale određene vrste u Tablici 9 ne uzimaju u obzir vidi se da se te vrste nalaze u crijevnoj mikrobioti te su identificirane iz istog uzorka fecesa na spektrometru masa ESI-Q-TOF i MALDI-TOF/TOF te bioinformatičkom metodom baziranom na LSI.

Tablica 9: Prikaz identificiranih vrsta iz uzorka fecesa dobivenih spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF i snimanjem u pozitivnom i negativnom načinu rada

Tax ID	Species	ΣSSniz	ΣRHSS	ΣSS	ΣRH
657323	<i>Ruminococcus sp. SRI/5</i>	16	0.1535	2	13.16
411459	<i>Ruminococcus obeum ATCC 29174</i>	16	0.1535	2	13.11
86665	<i>Bacillus halodurans</i>	0	0	0	13.41
272558	<i>Bacillus halodurans C-125</i>	0	0	0	13.26
1162282	<i>Rhodanobacter sp. 115</i>	0	0	0	13.26
1322	<i>Blautia hansenii</i>	0	0	0	12.74
537007	<i>Blautia hansenii DSM 20583</i>	0	0	0	12.74
658083	<i>Lachnospiraceae bacterium 6_1_63FAA</i>	0	0	0	12.09
583345	<i>Methylothermobacter mobilis JLW8</i>	0	0	0	11.45
359408	<i>Methylothermobacter mobilis</i>	0	0	0	11.45

4.3. Rezultati 16S rRNA sekvencioniranja gena crijevnog mikrobioma



Slika 12 : Kružni dijagram zastupljenosti bakterijskih rodova u mikrobioti ispitivanog uzorka izrađen programskim alatom Krona

Rezultat obrade sirovih podataka sekvencioniranja fragmenta gena 16S rRNA u programu QIIME je biom tablica, koja sadrži sve informacije o sekvencama i taksonomskoj identifikaciji uzoraka i kružni graf na slici 8 koji prikazuje taksonomske skupine crijevne mikrobiote na razini roda. Iz grafa je vidljivo da su najzastupljenija koljena *Firmicutes* (60%), *Bacteroidetes* (31%) i *Actinobacteria* (7%) i *Proteobacteria* (2%). Porodica *Lachnospiraceae* koljena *Fimicutes* čini 26% ukupno identificiranih bakterija. U literaturnim podacima koljena *Bacteroidetes* i *Firmicutes* zajedno čine od 70% do 90 % bakterija u uzorku fecesa gdje su redovi *Bacteroidales* i *Clostridiales* najdominantniji (Penington i dr., 2018).

Unutar porodice je nalazi se rod *Blautia* koji je određen i na MALDI-TOF/TOF. *Blautia spp.* je anaerobna bakterija čija je uloga razgradnja kompleksnih ugljikohidrata u crijevu. Količina bakterije se smanjuje kod pacijenata oboljelih od raka debelog crijeva (Chen i dr., 2012). Unutar iste porodice je identificiran rod *Copricoccus* koji aktivno sudjeluje u fermentaciji ugljikohidrata stvarajući butirat i octenu kiselinu (Holdeman i dr., 1974). U porodici *Ruminococcaceae* je vrsta *Faecalibacterium prausnitzii* i rod *Ruminococcus* koji su identificirani i metodom metaproteomike. Rod *Streptococcus* iz porodice Streptococcaceae čini 9% od ukupnih bakterija u uzorku. U koljenu *Bacteroidetes*, ali i ukupno najzastupljeniji rod je *Bacteroides* koji čini 21% identificiranih bakterija. Sekvencioniranjem 16 S rRNA gena je dokazana prisutnost roda *Bifidobacterium* koljena *Actinobacteria* koji nije pronađen nijednim pristupom metaproteomike u ovom radu.

Bakterije koljena Firmicutes i Bacteroidetes identificirane su u podjednakom broju metodama proteomike i genomike, te je u uzorku prevladavalo koljeno Firmicutes. Pokazano je da se omjer koljena *Firmicutes/Bacteroidetes* u GI mikrobioti povećava starenjem pojedinca, a s obzirom da je starosna dob donora fecesa >55 rezultati su u skladu s očekivanjima. Nedostatak *Bifidobacterium* također se može objasniti starosnom dobi donora s obzirom da te bakterije prevladavaju kod mlađih osoba (Mariat i sur., 2009). Metagenomska analiza je rezultirala s manjim postotkom koljena *Proteobacteria* u odnosu na metaproteomiku, dok je koljeno *Actinobacteria* u oba pristupa podjednako zastupljeno.

5. ZAKLJUČCI

- 1.) 4% SDS, B-PER i ultrazvuk tijekom izolacije proteina iz bakterijske biomase u fecesu rezultirale su s najviše identificiranih peptida i bakterijskih vrsta od ispitanih metoda
- 2.) Bioinformatičkim alatom razvijenim na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu i spektrometrom masa ESI-Q-TOF Synapt G2-Si identificirano je više peptida i više bakterijskih vrsta nego spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF.
- 3.) Najzastupljenije koljeno u uzorku je Firmicutes. Najviše proteina iz koljena Firmicutes je identificirano iz vrsta *Faecalibacterium prausnitzii* i roda *Ruminococcus*.
- 4.) Proteomskim pristupom i metodologijom CAF-/CAF+ je identificiran najzastupljeniji rod mikroorganizama *Ruminococcus sp.* iz bakterijske biomase fecesa.
- 5.) Rezultati metagenomske analize imaju visok stupanj podudarnosti s rezultatima proteomike za koljena *Firmicutes*, *Bacteroidetes* i *Actinobacteria*, dok se za koljeno *Proteobacteria* značajno razlikuju.

6. LITERATURA

1. Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes L.N., Olsen, I., Dewhirst, F.E. (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* **43**, 5721–5732.
2. Andersen, J. S. i Mann, M. (2000) Functional genomics by mass spectrometry. *FEBS Lett.* **480**, 25-31.
3. Aebersold, R., Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics 422, 10.
4. Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H., 2004. Protein sequence databases. *Current Opinion in Chemical Biology* **8**, 76–80.
5. Baucells, B.J.; Mercadal Hally, M.; Álvarez Sánchez, A.T.; Figueras Aloy, J. (2015). "Asociaciones de probióticos para la prevención de la enterocolitis necrosante y la reducción de la sepsis tardía y la mortalidad neonatal en recién nacidos pretérmino de menos de 1.500g: una revisión sistemática". *Anales de Pediatría.* **85**:247-55
6. Bäckhed F. (2011) Programming of host metabolism by the gut microbiota. *Ann. Nutr. Metab.* **58**(Suppl 2), 44–52
7. Banerjee, S. i Mazumdar, S. (2012) “Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte” *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, 1–40.
8. Bengmark S. (1998) Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* **42**, 2–7
9. Bjellqvist, B., Pasquali, C., Ravier, F., Sanchez, J.C., Hochstrasser, D. (1993) A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis.* **14**, 1357-1365.
10. Calderón-González, K.G., Hernández-Monge, J., Herrera-Aguirre, M.E., Luna-Arias, J.P., 2016. Bioinformatics Tools for Proteomics Data Interpretation, in: Mirzaei, H., Carrasco, M. (Eds.), *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications*. Springer International Publishing, Cham, pp. 281–341.
11. Cagney, G., Amiri, S., Premawaradena, T., Lindo, M., Emili, A. (2003) In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. *Proteome Sci.* **1**, 1-15.
12. Celis, J. E. i Gromov, P. (1999) 2D protein electrophoresis: can it be perfected? *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 16-21.

13. Chang C. and Lin H. (2016) Dysbiosis in gastrointestinal disorders. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **30**, 3–15
14. Cindrić M., Marković A., Horvatić A. (2009) Sprengnute tehnike tekućinski kromatograf-spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina* **45**, 218–232.
15. Cindrić M., sHranueli D., Starčević A. (2013). MALDI protocol for identification of microorganisms by protein reading concept. Pristupljeno kolovoz 2018. <http://rapidcell.proteinreader.com/maldi-msms-biotypization-protocol/>
16. Claesson, M.J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E. (2011) Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**(Supplement 1), 4586–4591.
17. Conway, P.L. (1995) Microbial ecology of the human large intestine. U: Human Colonic Bacteria: Nutrition, Physiology, and Pathology, (Gibson, G. R., Macfarlane, G. T., ured.), Boca Raton: CRC, 1–24.
18. D'Argenio, V., Salvatore, F., 2015. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta* **451**, 97–102.
19. Dethlefsen, L. i Relman, D.A. (2011) Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 4554–4561.
20. Donaldson, G.P., Lee, S.M. i Mazmanian, S.K. (2015) Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 20–32.
21. Dunn, M. J. (2000) Studying heart disease using the proteomic approach. *Drug Discov. Today.* **5**, 76–84.
22. Eckburg P.B. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635–1638
23. Egert, M., Graaf, A. A., Smidt, H., Vos, W. M., Venema, K. (2006) Beyond diversity: Functional microbiomics of the human colon. *Trends Microbiol.* **14**, 86–91.
24. Eisenberg, D., Marcotte, E.M., Xenarios, I., Yeates, T.O. (2000) Protein function in the post-genomic era. *Nature.* **405**, 823–826.
25. Faveri, M., Mayer, M.P., Feres, M., de Figueiredo, L.C., Dewhirst, F.E., Paster, B.J. (2008) Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiol Immunol.* **23**, 112–118.
26. Gauthier, M. J. (1982). "Validation of the Name *Alteromonas luteoviolacea*". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**: 82.

27. Galić, N. (2004) Elektoraspršenje - ionizacija u masenoj spektrometriji. *Kem. Ind.* **53**, 117–123.
28. Galić, N., Cindrić, M. (2008) Analiza proteina spektrometrijom masa. *Kem. Ind.* **57**, 231-243.
29. Gao, Z., Tseng, C.H., Pei, Z., Blaser, M.J. (2007) Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proc Natl Acad Sci.* **104**, 2927–2932.
30. Gensollen, T., Iyer, S.S., Kasper, D.L., Blumberg, R.S. (2016) How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science.* **352**, 539–544.
31. Gérard, P. (2016) Gut microbiota and obesity. *Cell Mol. Life Sci.* **73**, 147–162.
32. Gill, S.R., Pop, M., DeBoy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S. (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* **312**, 1355–1359.
33. Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science.* **274**, 546, 563-567.
34. Graves, P.R., Haystead, T.A.J. (2002) *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **66**, 39–63.
35. Gu, S., Chen, D., Zhang, J.N., Lv, X., Wang, K., Duan, L.P. (2013) Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract. *PLoS ONE.* **8**, e74957
36. Gustafsson, J.K., Ermund, A., Johansson, M.E.V., Schutte, A., Hansson, G.C., Sjovall, H. (2012) An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **302**, G430–G438.
37. Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1720-1730.
38. Hill, M. J., (1997) Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur. J. Cancer Prev.* **6**, 43-45.
39. Hoffmann, E., Stroobant, V. (2007) Mass spectrometry: Principles and applications, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
40. Hollister, E. B., Gao, C., Versalovic, J. (2014) Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology.* **146**, 1449–1458.
41. Hooper L.V. and Macpherson A.J. (2010) Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 159–169

42. Hiergeist, A., Gläsner, J., Reischl, U., Gessner, A., 2015. Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing: Figure 1. *ILAR J.* **56**, 228–240.
43. Horvatić, A., Cindrić, M. (2009) Analiza farmaceutskih peptida spektrometrijom masa **45**, 258-263.
44. Hugon, P., Dufour, J.-C., Colson, P., Fournier, P.E., Sallah, K., Raoult, D. (2015) A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *Lancet Infect. Dis.* **15**, 1211–1219.
45. Huycke, MM.; Spiegel, CA.; Gilmore, MS. (Aug 1991). "Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*". *Antimicrob Agents Chemother.*
46. Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D. N. (2015) Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* **21**, 8836–8847.
47. Ji, B., Nielsen, J.(2015) From next-generation sequencing to systematic modeling of the gut microbiome. *Frontiers in Genetics* **6**.
48. Jovel, J., Patterson, J., Wang, W., Hotte, N., O’Keefe, S., Mitchel, T., Perry, T., Kao, D., Mason, A.L., Madsen, K.L., Wong, G.K.-S. (2016) Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Frontiers in Microbiology* **7**.
49. Jung, E., Heller, M., Sanchez, J.C., Hochstrasser, D.F. (2000) Proteomics meets cell biology: the establishment of subcellular proteomes. *Electrophoresis.* **21**, 3369-3377.
50. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
51. Lane, C. S. (2005) Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 848–869.
52. Lederberg J, McCray AT. (2001) 'Ome Sweet 'Omics—a genealogical treasury of words. *Scientist.* **15**:8.
53. Li J., Jia H., Cai X., Zhong H., Feng Q., Sunagawa S. et al. (2014) An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* **32**, 834–841.
54. Li, H., Limenitakis, J.P., Fuhrer, T., Geuking, M.B., Lawson, M.A., Wyss, M. (2015) The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nat. Commun.* **6**, 8292.

55. Link, A. J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M., Yates III, J.R. (1999) Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **17**, 676-682.
56. Madigan M; Martinko J, eds. (2005). Brock Biology of Microorganisms (11th ed.). Prentice Hall
57. McCormack, A. L., Schieltz, D.M., Goode, B., Yang, S., Barnes, G., Drubin, D., Yates III, J.R. (1997) Direct analysis and identification of proteins in mixtures by LC/MS/MS and database searching at the low-femtomole level. *Anal. Chem.* **69**, 767-776.
58. Mizrahi-Man O., Davenport E.R., Gilad Y., and White B.A. (2013) Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. *PLoS ONE.* **8**.
59. Moya, A. i Ferrer, M. (2016) Functional redundancy-Induced stability of Gut microbiota subjected to disturbance. *Trends Microbiol.* **24**, 402–413.
60. Nesvizhskii, A.I., 2010. A survey of computational methods and error rate estimation procedures for peptide and protein identification in shotgun proteomics. *J. Proteom.* **73**, 2092–2123.
61. Novakova, L., Matysova, L., Solich, P. (2006) Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta* **68**, 908-918.
62. Opiteck, G. J., Lewis, K.C., Jorgenson, J.W., Anderegg, R.J. (1997) Comprehensive on-line LC/LC/MS of proteins. *Anal. Chem.* **69**, 1518-1524.
63. Pandey, A. i Mann, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* **405**, 837-846.
64. Patton, W. F. (2000) A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis.* **21**, 1123-1144.
65. Pei, Z, Bini, EJ, Yang, L, Zhou, M, Francois, F, Blaser, MJ. (2004) Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci.* **101**, 4250–4255.
66. Penington, J. S., Penno, M. A. S., Ngui, K. M., Ajami, N. J., Roth-Schulze, A. J., Wilcox, S. A. (2018). Influence of fecal collection conditions and 16S rRNA gene sequencing at two centers on human gut microbiota analysis. *Scientific Reports*, 8(1), 4386.
67. Pester, Michael; Maixner, Frank; Berry, David; Rattei, Thomas; Koch, Hanna; Lückner, Sebastian; Nowka, Boris; Richter, Andreas; Spieck, Eva (2014-10-01). "NxB

- encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing Nitrospira". *Environmental Microbiology*.
68. Plumb, R., Castro-Perez, J., Gragner, J., Beattie, I., Joncour, K., Wright, A. (2004) Rapid Commun. *Mass Spectrom.* **19**, 2331.
 69. Poretsky R., Rodriguez-R L.M., Luo C., Tsementzi D., Konstantinidis K.T., Rodriguez-Valera F. (2014) Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS ONE*. **9**.
 70. Rappsilber, J., Siniosoglou, S., Hurt, E.C., Mann, M. (2000) A generic strategy to analyze the spatial organization of multi-protein complexes by cross-linking and mass spectrometry. *Anal. Chem.* **72**, 267-275.
 71. Rodriguez, J.M. (2015) The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb. Ecol. Health Dis.* **26**, 26050.
 72. Sanchez, J. C. i Hochstrasser, D.F. (1999) High-resolution, IPG-based, mini two-dimensional gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* **112**, 227-233.
 73. Schroeder, B.O. i Bäckhed, F. (2016) Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat. Med.* **22**, 1079–1089.
 74. Seidler, J., Zinn, N., Boehm, M.E., Lehmann, W.D., 2010. *De novo* sequencing of peptides by MS/MS. *Proteomics* **10**, 634–649.
 75. Song, Z., Chen, L., Xu, D. (2010). Bioinformatics Methods for Protein Identification Using Peptide Mass Fingerprinting, in: Hubbard, S.J., Jones, A.R. (Eds.), *Proteome Bioinformatics*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 7–22.
 76. Standing, K., 2003. Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry. *Cur. Opini. Struct. Biol.* **13**, 595–601.
 77. Seger, C., Griesmacher, A. (2007) Some important aspects of implementing tandem mass spectrometry in a routine clinical laboratory environment. *Biochem. Medica.* **17**.
 78. Shevchenko, A., O. N. Jensen, A. V. Podtelejnikov, F. Sagliocco, M. Wilm, O. Vorm, P. Mortensen, H. Boucherie, and M. Mann. (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 14440-14445.
 79. Slade, S. E. (2013) Application of label-free mass spectrometry-based proteomics to biomarker discovery. PhD thesis, University of Warwick.

80. Suau A., et al. (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4799–4807
81. Swartz, M. (2005) J. Liquid Chromatogr. *Relat. Technol.* **28**, 1253.
82. Thursby, E., Juge, N. (2017) Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* **474**, 1823–1836.
83. Tong, W., Link, A., Eng, J.K., Yates III, J.R. (1999) Identification of proteins in complexes by solid-phase microextraction/multistep elution/capillary electrophoresis/tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **71**, 2270-2278.
84. Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E. (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* **457**, 480–484.
85. Van den Abbeele, P., Belzer, C., Goossens, M., Kleerebezem, M., De Vos, W.M., Thas, O. (2013) Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *ISME J.* **7**, 949–961
86. Vyatkina, K., Dekker, L.J.M., Wu, S., VanDuijn, M.M., Liu, X., Tolić, N., Luider, T.M., Paša-Tolić, L. (2017) De Novo Sequencing of Peptides from High-Resolution Bottom-Up Tandem Mass Spectra using Top-Down Intended Methods. *Proteomics.* **17**.
87. Verhelst, R., Verstraelen, H., Claeys, G., Verschraegen, G., Delanghe, J., Van Simaey, L., De Ganck, C., Temmerman, M., Vanechoutte, M. (2004) Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol.* **4**, 16.
88. Voreades, N., Kozil, A., Weir, T. L. (2014) Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front. Microbiol.* **5**, 1-9.
89. Wasinger, V. C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L., Humphery-Smith, I. (1995) Progress with gene-product mapping of the *Mollicutes: Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis.* **16**, 1090-1094.
90. Waters (2015) Beginners Guideto UPLC, <http://www.waters.com/waters/en_HR/UPLC---Ultra-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?cid=134803622&locale=en_HR>. Pristupljeno 12. travnja 2018.

91. Watson, D.G. High-performance liquid chromatography. U: Pharmaceutical analysis. Watson DG, urednik, Edinburgh, Churchill Livingstone, 2012, str. 323-325.
92. Wells, J. M., McLuckey, S. A. (2005) Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. *Method. Enzymol.* **402**, 148–185.
93. Wilm, M., Mann, M. (1996) Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem.* **68**, 1-8.
94. Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T., Mann, M. (1999) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature.* **379**, 466-469.
95. Woodmansey, E.J., McMurdo, M.E.T., Macfarlane, G.T., Macfarlane, S. (2004) Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6113–6122.
96. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, Lewis JD (2011). "Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes". *Science.* **334** (6052): 105–8
97. Yates, J. R., III. (1998) Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass Spectrom.* **33**, 1-19.
98. Zhang, G., Annan, R.S., Carr, S.A., Neubert, T.A., 2014. Overview of Peptide and Protein Analysis by Mass Spectrometry: Peptide and Protein Analysis by MS, in: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.), Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 10.21.1-10.21.30.
99. Zhang, X., Li, L., Mayne, J., Ning, Z., Stintzi, A., Figeys, D., 2017. Assessing the impact of protein extraction methods for human gut metaproteomics. *Journal of Proteomics.*
100. Zhou, X., Bent, S.J., Schneider, M.G., Davis, C.C., Islam, M.R., Forney, L.J. (2004) Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology.* **150**, 2565–2573.
101. Zitomersky, N. L., Atkinson, B. J., Franklin, S. W., Mitchell, P. D., Snapper, S. B., Comstock, L. E., & Bousvaros, A. (2013). Characterization of Adherent Bacteroidales from Intestinal Biopsies of Children and Young Adults with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE*, **8**(6).

7. PRILOZI

Svi navedeni prilozi uključujući i cjelovit tekst Diplomskog rada (Diplomski rad ES.pdf) se nalaze na presnimljivom kompaktnom disku (CD-R) pod nazivom „Diplomski rad ES: PRILOZI“.

Na disku se nalaze slijedeći podaci:

1. Proteini identificirani masenim spektrometrom masa ESI-Q-TOF Synapt G2-Si i potvrđeni MS1 spektrima iz uzoraka fecesa D1-D7 i taksonomska analiza istih uzoraka
2. Proteini identificirani masenim spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF i LSI metodom i potvrđeni MS1 spektrima iz uzoraka fecesa
3. Sirovi podaci sekvencioniranja fragmenta gena 16S rRNA dva dokumenta u FASTQ formatu koji sadržavaju podatke o očitanoj slijedi nukleotida i o kvaliteti očitavanja svakog pojedinog nukleotida
4. Etičke potvrde od strane PBF-a i KB Srebrnjak na temelju HRZZ projekta IP-06-2016 "microequilibrium".

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Svetličić

Student/Studentica