



FUNKČNÍ VZOREK

Probiotický lyzát snižující množství imunotoxických prolaminů

**RNDr. Lubomír Janda, Ph.D.
Mgr. Helena Juřicová
Mgr. Adam Norek, Ph.D.
doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.
Bc. Michaela Šťastná**

**5791
2019**

Funkční vzorek 5791/2019

Probiotický lyzát snižující množství imunotoxických prolaminů

Autoři:

RNDr. Lubomír Janda, Ph.D.

Mgr. Helena Juřicová

Mgr. Adam Norek, Ph.D.

doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.

Bc. Michaela Šťastná

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu: "Rozvoj systému podpory
Proof – of – concept na VÚVeL" TG03010038.

Dílčí projekt s názvem „LackSal-I: Směs probiotické kultury s prebiotikem k redukci
vlivu imunotoxických peptidů u lidí citlivých

na gluten“ v rámci programu Technologické agentury ČR - program GAMA.

2019

ISBN 978-80-88233-85-5

Obsah

1. Úvod	3
2. Předmět funkčního vzorku	4
3. Vlastní popis funkčního vzoru	4
Kultivace	4
Analýza genomu	4
Aminokyselinová sekvence enzymu	5
Tvorba lyzátu	8
Měření enzymové aktivity	8
Analýza rezistence k antibiotikům.....	9
4. Srovnání novosti postupů.....	10
5. Uplatnění funkčního vzorku	10
6. Ekonomické aspekty	10
7. Seznam použité literatury	11
8. Dedikace	11

1. Úvod

Probiotické mikroorganismy patří mezi nedílnou součást střevní mikrobioty, která čítá tisíc i více druhů mikroorganismů. Tyto mikroorganismy hrají důležitou úlohu v lidském zdraví, neboť nemají vliv pouze na střevo, ale také na imunitní systém, nervovou soustavu či metabolismus.(1, 2) Probiotika jsou definována Světovou zdravotnickou organizací jako „živé mikroorganismy, které jsou-li podávány v adekvátním množství, přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele“.(3) Mezi nejznámější zástupce probiotických bakterií patří rod *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Tyto příznivě působící bakterie také modulují imunitní systém hostitele, stimulují jeho obranné mechanismy, produkují organické kyseliny a peroxid vodíku, kterým snižují pH. Také produkují molekuly, které způsobují změny v genové expresi hostitele. (4) Přítomnost probiotických mikroorganismů však sama o sobě k ochraně střeva nestačí. Jsou to jejich produkty, které plní v trávicím traktu svou funkci. (5) Mezi jednu z důležitých oblastí působení probiotik patří ovlivnění metabolismu hostitele, ke kterému dochází skrze bakteriální produkty, například enzymy. Jedním z probiotických kmenů s bohatým enzymatickým aparátem je kmen *Lactobacillus salivarius*. Tento organismus získal své jméno podle slin z dutiny ústní, neboť z ní byl tento kmen prvně izolován. Jeho jméno tedy přímo odkazuje ke spojitosti s trávicím traktem savců. V posledních letech získala tato bakterie pozornost především jako potenciální probiotický organismus, jehož vlastnosti jsou z velké části závislé na konkrétním druhu *L. salivarius*. (8) Je to druh bakterie, který se často vyskytuje v dutině ústní a trávicím traktu nebo také v mateřském mléce. Tato bakterie je odolná vůči žaludečním kyselinám a je považována za vhodného kandidáta při léčení gastrointestinálních nemocí. (9, 10, 11) Bakterie *L. salivarius*, jsou schopny získat početní dominanci ve střevě nad jinými bakteriemi rodu *Lactobacillus*, což zvyšuje schopnost přichytit se a přežít v trávicím traktu. Splňují tedy jedno z velmi důležitých kritérií pro bakterie, které jsou považovány za probiotické. (8) Jedním z enzymů u tohoto kmenu je X-prolyl dipeptidyl aminopeptidáza, která se ukázala jako schopná štěpit imunotoxické peptidy, které se nacházejí v lepku a které vyvolávají imunitní odpověď u citlivých jedinců. Z literatury jsou známy peptidy s prokázanou významností v etiologii celiakie. Například peptid o velikosti 33 aminokyselin, vzniklý štěpením α -gliadinu LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (12), nebo identický menší peptid o velikosti 16 aminokyselin QLQFPQPQLPYPQPQ (13). Z ω -gliadinu, respektive z C-konce hordeinu je znám peptid o velikosti 17 aminokyselin QPQQPFPQPQQPFPWQP (13). Při porušeném střevním epitelu, mohou tyto peptidy procházet střevní bariérou. Tento enzym byl zkoumán jak na úrovni genomu, tak na úrovni proteomu a bylo zjištěno, že se u tohoto enzymu vyskytují značné rozdíly napříč jednotlivými kmeny. Po požití lepku v potravě dochází k štěpení proteinu lidskými trávicími enzymy, které jej však dokáží štěpit na menší peptidy. Tyto peptidy jsou přirozeně bohaté na aminokyseliny glutamin a prolin, což způsobuje neschopnost štěpit tyto segmenty běžnými lidskými enzymy jako je například trypsin. Na rozdíl od trávicích enzymů přítomných v lidském trávicím traktu, některé bakteriální enzymy štěpí přímo před prolinem a tímto dochází k rozštěpení lepkových peptidů a snížení jejich imunotoxicity. Bakteriální lyzáty mají kromě lytických enzymů i proteiny a peptidy, které jsou známy také jako bakteriální imunomodulátory. Práce zahrnující použití usmrcených bakterií k navození léčivého účinku jsou známy již více než 100 let. V posledních desetiletích byly potvrzeny komplexní příznivé vlivy těchto bakteriálních lyzátů na imunitní systém člověka a do terminologie byli postupně zařazeny jako imunomodulátory. Tyto bakteriální antigeny patří mezi zcela běžně se vyskytující imunitní podněty. Kromě bílkovin obsahují lyzáty i různé metabolity, jako například vitamíny nebo krátké mastné kyseliny které využívá lidské tělo. Všechny tyto bakteriální produkty je možno doručit do trávicího traktu ve formě kapsle, nebo je aplikovat na kůži či v jiném místě potřeby. (7)

2. Předmět funkčního vzorku

Cílem předkládaného funkčního vzorku bylo najít a vybrat bezpečný bakteriální kmen pro lyzát schopný štěpit imunotoxické sekvence prolaminů vyskytující se v některých obilovinách. Tento bakteriální kmen bylo nutno charakterizovat na úrovni genomu a proteomu a prokázat účinek jeho lyzátu při aktivním měření. Také bylo nutné prokázat, zda nepředstavuje bezpečnostní riziko z hlediska přenosu rezistentních genů. Smyslem práce bylo najít způsob, jak eliminovat, respektive snížit koncentraci glutenových peptidů, které vyvolávají reakci imunitního systému u predisponovaných jedinců.

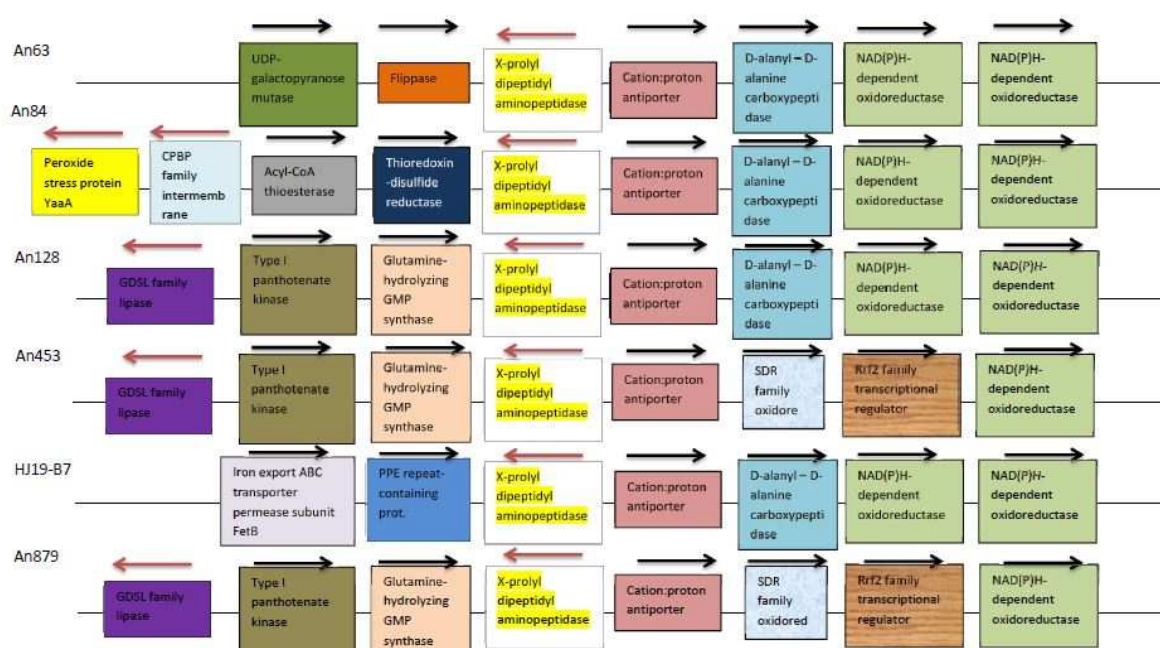
3. Vlastní popis funkčního vzoru

Kultivace

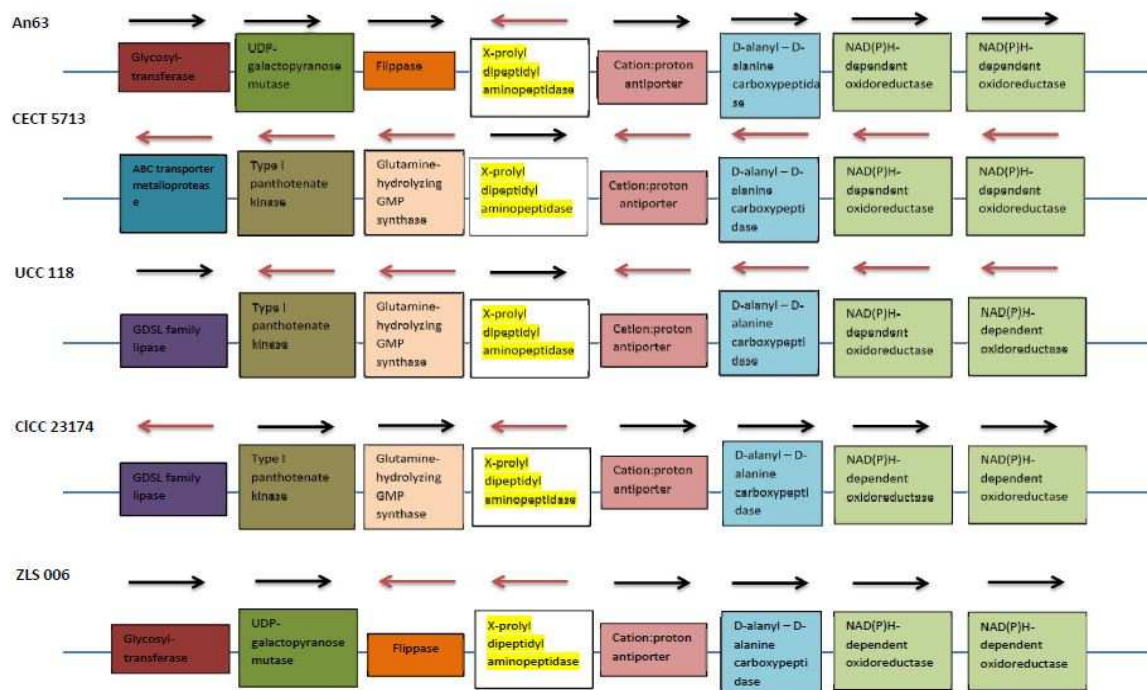
BHI médium (Sigma Aldrich) pro kultivaci bakterií o objemu 5 ml bylo nejprve na 24 hodin vloženo do anaerobní atmosféry pro vysycení a po uplynutí doby bylo očkováno 20 μ l kultury ze zamražené bakteriální konzervy $OD_{600} = 1$. Čisté kultury bakterie *Lactobacillus salivarius* kmen An63 a An84, izolované z animálního zdroje (střevo mláďete Kura domácího - *Gallus domesticus*) byly kultivovány v anaerobní atmosféře (10% CO_2 , 5% H_2 a 85% N_2) v anaerobním boxu (Bactron) při 37°C po dobu 24 hodin.

Analýza genomu

Z dostupných dat z celogenomového sekvenování bylo porovnáno okolí genu pro enzym X-prolyl dipeptidyl aminopeptidázu u šesti námi dostupných kmenů (An63, An84, An128, An453, HJ19-B7 a An879) (VÚVEL, místní sbírka mikroorganismů) a také u některých kmenů, jejichž genomové sekvence jsou dostupné v databázi genomů (NCBI), konkrétně se jedná o kmeny CECT5713, UCC118, CICC23174 a ZLS006. U genu pro X-prolyl dipeptidyl aminopeptidázu byla pozorována překvapivě velká genomová variabilita napříč zkoumanými kmeny, což může mít vliv na aktivitu enzymu.



Obrázek 1: Zobrazení genomového okolí genu pro X-prolyl dipeptidyl aminopeptidázu u kmenů An63, An84, An128, An453, HJ19-B7 a An879.



Obrázek 2: Zobrazení genomového okolí genu pro X-prolyl dipeptidyl aminopeptidázu u kmenů An63, CECT5713, UCC118, CICC23174 a ZLS006.

Aminokyselinová sekvence enzymu

Při porovnání aminokyselinových sekvencí genu pro vybraný enzym u různých animálních kmenů *Lactobacillus salivarius* byla zjištěna překvapivá variabilita. Kmen An63 obsahoval oproti konsensu ostatních genů pro X-prolyl dipeptidyl aminopeptidázu 23 aminokyselinových změn (2,83 %). Počty změn u ostatních kmenů jsou vyjádřeny v tabulce číslo 1.

X-prolyl dipeptidyl aminopeptidáza		
Kmen	Počet změn	Procentuální vyjádření počtu změn
An63	23	2,83%
An84	11	1,35%
An128	16	1,84%
An453	21	2,58%
An879	21	2,58%
HJ19-B7	6	0,73%

Tabulka 1: Vyjádření počtu změn v aminokyselinové sekvenci enzymu X-prolyl dipeptidyl aminopeptidázy u dostupných kmenů. Jako změna v sekvenci byla brána jiná aminokyselina vzhledem k většinovému zastoupení v dané pozici.

Pokud porovnáme aminokyselinovou sekvenci X-PDAD kmene An63, který bereme jako nejvhodnější pro použití bakteriálního lyzátu s ostatními X-prolyl dipeptidyl aminopeptidázami, nejvíce změn v sekvenci enzymu (43) můžeme pozorovat u kmene An453 a An879. Dále byla proteinová sekvence porovnána s genomem z kmenů přítomných v databázi NCBI. Bylo zjištěno, že přestože je genomové okolí kmene ZLS006 nejvíce podobné *L. salivarius* An63, v aminokyselinové sekvenci se liší na 40 místech, což musí mít vliv na aktivitu enzymu.

An879	MVINILKERIVIMKLNQFAHVKVPFEQKLAELNRI AFLHAGDEDLASNHIYRLFLERAFP	60
An453	MVINILKERIVIMKFNQFAHVKVPFEQKLAELNRI AFLHAGDEDLASNHIYRLFLERAFP	60
An63	MVINILKERIVIMKFNQFAHVKVPFEQKLAELNRI AFLHAGDEDLASNHIYRLFLERAFP	60
An128	MVINILKERTVIMKFNQFAHVQVPFEQKLT ELNRI AFLHAGDEDLASNHIYRLFLERAFP	60
An84	MVINILKERIVIMKFNQFAHVKVPFEQKLAELNRI AFLHAGDEDLASNHIYRLFLERAFP	60
HJ19-B7	MVINILKERIVIMKFNQFAHVKVPFEQKLAELNRI AFLHAGDEDLASNHIYRLFLERAFP	60
An879	NFKTEAAKNHALSNLAATENADILTYLNSSKINARIFYAVGLQLLGFEAELDFDLKDPFS	120
An453	NFKTEAAKNHALSNLAATENADILTYLNSSKINARIFYAVGLQLLGFEAELDFDLKNPFS	120
An63	NFKTEAAKNHALSNLAATENTDILTYLNSSKINARVIFYAVGLQLLGFEAELDFDLKDPFS	120
An128	NFKTEAAKNHALSNLAATENTDILTYLNSSKINARVIFYAVGLQLLGFEAELDFDLKDPFS	120
An84	NFKTEATAKNHALSNLAATENADILTYLNSSKINARVIFYAVGLQLLGFEAELDFDLKDPFS	120
HJ19-B7	NFKTEAAKNHALSNLAATENTDILTYLNSSKINARVIFYAVGLQLLGFEAELDFDLKDPFS	120
An879	AMDKNLNPYQKEINHRDDVINAWYDLLCTSTKKGQNLLDILANRGYFTQFYQLNLTEPIF	180
An453	AMDKNLNPYQKEINHRDDVINAWYDLLCTSTKKGQNLLDILANRGYFTQFYQLNLTEPIF	180
An63	TMDKNLNPYQKEINHFNPDVINAWYDLLCTSTKKGQTLLDILANRGYFTQFYQLNLAEPIF	180
An128	AMDKNLNPYQKEINHRDDVINAWYDLLCTSTKKGQNLLDILANRGYFTQFYQLNLTEPIF	180
An84	AMDKNLNPYQKEINHRDDVINAWYDLLCTSTKKGQNLLDILANRGYFTQFYQLNLTEPIF	180
HJ19-B7	AMDKNLNPYQKEINHRDDVINAWYDLLCTSTKKGQNLLDILANRGYFTQFYQLNLTEPIF	180
An879	FNGKAQPVFDTNKLIEVVYVESELDTDQNGKRDLLKVIITRPAMTDNGMKVPTIFTASP	240
An453	FNGKAQPVFDTNKLIEVVYVESELDTDQDGKRDLLKVIITRPAMTDNGMKVPTIFTASP	240
An63	FNGKAQPVFDTSKLIEVVYVESELDTDHDGKRDLLKVIITRPAMTDNGMKVPTIFTASP	240
An128	FNGKAQPVFDTNKLIEVVYVESELDTDQDGKRDLLKVIITRPAMTDNGMKVPTIFTASP	240
An84	FNGKAQPVFDTNKLIEVVYVESELDTDQDGKRDLLKVIITRPAMTDNGMKVPTIFTASP	240
HJ19-B7	FNGKAQPVFDTNKLIEVVYVESELDTDQDGKRDLLKVIITRPAMTDNGMKVPTIFTASP	240
An879	YYLGTNDASAEKMMHSVDLPITRKEVKPLSYQDIEYHKPETKLPKKRPVVISTKNAEESW	300
An453	YYLGTNDASAEKMMHSVDLPITRKEVKPLSYQDIEYHKPETKLPKKRPVVISTKNAEESW	300
An63	YYLGTNDASAEKMMHSVDLPITRKEVKPLSYQDIEYHKPATKLPKKRPVVISTKNAEESW	300
An128	YYLGTNDASAEKMMHSVDLPITRKEGKPLSYQDIEYHKPETKLPKKRPVVISTKNAEESW	300
An84	YYLGTNDASAEKMMHSVDLPITRKEVKPLSYQDIEYHKPETKLPKKRPVVISTKNAEESW	300
HJ19-B7	YYLGTNDASAEKMMHSVDLPITRKEVKPLSYQDIEYHKPETKLPKKRPVVISTKNAEESW	300
An879	EHLFTYTFNDYMLARGFAVVYSGGVGTLDSDGYRTCGDEAETLGAKDVVEWLNKRTAFT	360
An453	EHLFTYTFNDYMLARGFAVVYSGGVGTLDSDGYRTCGDEAETLGAKDVVEWLNKRTAFT	360
An63	EHLFTYTFNDYMLARGFAVVYSGGVGTLDSDGYRTCGDEAETLGAKDVVEWLNKRTAFT	360
An128	EHLFTYTFNDYMLARGFAVVYSGGVGTLDSDGYRTCGDEAETLGAKDVVEWLNKRTAFT	360
An84	EHLFTYTFNDYMLARGFAVVYSGGVGTLDSDGYRTCGDEAETLGAKDVVEWLNKRTAFT	360
HJ19-B7	EHLFTYTFNDYMLARGFAVVYSGGVGTLDSDGYRTCGDEAETLGAKDVVEWLNKRTAFT	360
An879	TKEANKAIPAWWSNGKVAMTGKSYLGTLATATATTGVEGLETIISEAAISSWYDYYREGG	420
An453	TKEANKAIPAWWSNGKVAMTGKSYLGTLATATATTGVEGLETIISEAAISSWYDYYREGG	420
An63	TKEANKAIPAWWSNGKVAMTGKSYLGTLATATATTGVEGLETIVSEAAISSWYDYYREGG	420
An128	TKEANKAIPAWWSNGKVAMTGKSYLGTLATATATTGVEGLETIISEAAISSWYDYYREGG	420
An84	TKEANKAIPAWWSNGKVAITGKSYLGTLATATATTGVEGLETIISEAAISSWYDYYREGG	420
HJ19-B7	TKEANKAIPAWWSNGKVAMTGKSYLGTLATATATTGVEGLETIISEAAISSWYDYYREGG	420
An879	LVIAPGGFPGEDADILAEECFSRQKSAGDYNRAKDGFNKFLSTITKEQDRTTGNNTFWD	480
An453	LVIAPGGFPGEDADILAEECFSRQKSAGDYNRAKDGFNKFLSTITRDQNRITGNNTFWD	480
An63	LVIAPGGFPGEDADILAEECFSRQKAGDYNRAKDGFNKFLSTITKDQDRTTGNNTFWD	480
An128	LVIAPGGFPGEDADILAEECFSRQKSAGDYNRAKDGFNKFLSTITKDQDRTTGNNTFWD	480
An84	LVIAPGGFPGEDADILAEECFSRQKSAGDYNRAKDGFKKFLSTITKDQDRTTGNNTFWD	480
HJ19-B7	LVIAPGGFPGEDADILAEECFSRQKSAGDYNRAKDGFNKFLSTITKEQDRTTGNNTFWD	480
An879	ARNYLKDVSNIKCDIVMVHGLNDWNVKLNKVNFLYNKLGDEVTKKLILHQGQHIYINNF	540
An453	ARNYLKDVGNIKCDIVMVHGLNDWNVKLNKVNFLYNKLGDEVTKKLILHQGQHIYINNF	540
An63	ARNYLKDVGNIKCDVVMVHGLNDWNVKLNKVNFLYNKLGDEVTKKLILHQGQHIYINNF	540
An128	ARNYLKDVVDNIKCDVVMVHGLNDWNVKLNKVNFLYNKLGDEVTKKLILHQGQHIYINNF	540
An84	ARNYLKDVGNIKCDIVMVHGLNDWNVKLNKVNFLYNKLSDEVTKKLILHQGQHIYINNF	540
HJ19-B7	ARNYLKDVGNIKCDVVMVHGLNDWNVKLNKVNFLYNKLGDEVTKKLILHQGQHIYINNF	540
An879	QSLDFTDMMNLWLSHKLYGIENNAKELLPDILVQNNTKESTWETYSSWQSKNFTKLYLDS	600
An453	QSLDFTDMMNLWLSHKLYGVENNAKELLPDILVQNNTKESTWETYSSWQSKNFTKLYLDS	600
An63	QSLDFTDMMNLWLSHKLYGVENNAKELLPDILVQNNTKESTWETYSSWQSKNFTKLYLDS	600
An128	QSLDFTDMMNLWLSHKLYGIENNAKELLPDILVQNNTKESTWETYSSWQSKNFTKLYLDS	600

An879	DSLSSQKKEKQILEFNDHLPEATFKHYQANLNSWKEEILASTSPKLEANRLIITSKPLKH	660
An453	DSLSEQKKEKQILEFSDYLPPEATFKHYQTNNINSWKEDILALTSPKLEDNRLIILTSEPLKH	660
An63	DSLSAQKKEKQILEFSDHLPEATFKHYQANINSWKEDILAPTSPKLQNNRLIILTSEPLKH	660
An128	DSLSAQKKEKQILEFNDHLPEATFKHYQANINSWKEDILTPSPKLEDNRLIILTSEPLKH	660
An84	DSLSAQKKEKQILEFSDHLPEATFKHYQANINSWKEDILAPTSPKLENNRLIILTSEPLNH	660
HJ19-B7	DSLSAQKKEKQILEFSDHLPEATFKHYQTNNINSWKEDILAPTSPKLQNNRLIILTSEPLKH	660
An879	ETLLKGVAIKIKLIASQLDHGLVSVKLVVDYGDAKRLGATPTILERRGLDLGYHWQEDNLV	720
An453	ETLLKGVAIKIKLIASQLDHGLVSVKLVVDYGDAKRLGATPTILERRGLDLGYHWQEDNLV	720
An63	EILLKGVAIKIKLITSQLDHGLISVKLVVDYGDAKRLGATPTILERRGLDLGYHWQEDNLV	720
An128	ETLLKGVAIKIKLIASQLDHGLVSVKLVVDYGDAKRLGATPTILERRGLDLGYHWQEDNLV	720
An84	ETLLKGVAIKIKLIASQLDHGLVSVKLVVDYGDAKRLGATPTILERRGLDLGYHWQEDNLV	720
HJ19-B7	EILLKGVAIKIKLIASQLDHGLFSVKLVVDYGDAKRLGATPTILERRGLDLGYHWQEDNLV	720
An879	EFKLAKETPFKMITQAHNLQNRHNNFNADLEANKFYDVEITTQPMFYHLPKGHKLGLV	780
An453	EFKLTKETPFKMITQAHNLQNRHNNFNADLEANKFYDVEITTQPMFYHLPKGHKLGLV	780
An63	EFKLAKETPFKMITQAHNLQNRHNNFSTDELEANKFYDVEITTQPMFYHLPKGHKLGLV	780
An128	EFKLAKETPFKMITQAHNLQNRHNDFSTDKLEANKFYDVEITTQPMFYHLPKGHKLGLV	780
An84	EFKLAKKTPFKMITQAHNLQNRHNDFSTDLEANKFYDVEITTQPMFYHLPKGHKLGLV	780
HJ19-B7	EFKLTKETPFKMITQAHNLQNRHNDFSTDLEANKFYDVEITTQPMFYHLPKGHKLGLV	780
An879	IYATDMENTLQGNEENSYRIDTTSYCLLPIEE	813
An453	IYATDMENTLQGNEENSYRIDTAGSYCLLPIE-	812
An63	IYATDMENTLQGNEENSYRIDTTSYCLLPIEE	813
An128	IYATDMENTLQGNEENSYRIDTIGSYCLLPIE-	812
An84	IYATDMENTLQGNEENSYRIDTTSYCLLPIEE	813
HJ19-B7	IYATDMENTLQGNEENSYRIDTTSYCLLPIEE	813
Obrázek 3: Srovnání aminokyselinové sekvence enzymu X-prolyl dipeptidyl aminopeptidázy u nám dostupných		
animálních kmenů <i>Lactobacillus salivarius</i> . Změna v aminokyselinové sekvenci je naznačena šedě.		
An63	MVINILKERIVIMKFNQFAHVKVPFEQKLAELNRIAFHLHAGDEDLASNHIYRLFLERAFP	60
An453	MVINILKERIVIMKFNQFAHVKVPFEQKLAELNRIAFHLHAGDEDLASNHIYRLFLERAFP	60
An63	NFKTEAAKNHALSNLAATENTDILTYLNSSKINARVIFYAVGLQLLGFEAELDFDLKDPFS	120
An453	NFKTEAAKNHALSNLAATENADILTYLNSSKINARIFYAVGLQLLGFEAELDFDLKNPFS	120
An63	TMDKLNLPYQKEINHFPNDVINAWYDLLCTSTKKGQTLDDILANRGYFTQFYKLNLAEP IF	180
An453	AMDKLNLPYQKEINHRDDVINAWYDLLCTSTKKGQNLLDILANRGYFTQFYQLNLTEP IF	180
An63	FNGKAQPVFDTSKLIHEVVYVESELDTDHDDKRDLLKVIITRPAVTDKGMKVPTIFTASP	240
An453	FNGKAQPVFDTNKLIHEVVYVESELDTDQDGKRDLLKVIITRPAVTDNGMKVPTIFTASP	240
An63	YYLGTNDASAEKMMHSVDLP IKRKEVKHLSYQDIEYHKPATKLPKKRPVVIS TKNAEESW	300
An453	YYLGTNDASAEKMMHSVDLP ITRKEVKPLSYQDIEYHKPETKLPKKRPVVIS TKNAEECW	300
An63	EHLFTYTFNDYMLARGFAVVYSGGVGTLDSDGYRTCGDEAETLGAKDVVEWLNGKRTAFT	360
An453	EHLFTYTFNDYMLARGFAVVYSGGVGTLDSDGYRTCGDEAETLGAKDVVEWLNGKRTAFT	360
An63	TKEANKAIPAWWSNGKVAMTGKSYLGTLATATATTGVEGLETIVSEAAISSWYDYYREGG	420
An453	TKEANKAIPAWWSNGKVAMTGKSYLGTLATATATTGVEGLETIISEAAISSWYDYYREGG	420
An63	LVIAPGGFPGEDADILAEECFSRQKAGDYNRARDGFNKFLSTITKDQDRTTGNYNTFWD	480
An453	LVIAPGGFPGEDADILAEECFSRQKSAGDYNRVKDGFNKFLSTITRDQNRITGNYNTFWD	480
An63	ARNYLKDVGNIKCDVVMVHGLNDWNVKLNKVNFLYNKLGDEVTKKLILHQGQHIYINNF	540
An453	ARNYLKDVGNIKCDVVMVHGLNDWNVKLNKVNFLYNKLGDEIVTKKLILHQGQHIYINNF	540
An63	QSLDFTDMMNLWLSHKLYGVENNAKELLPDILVQNNTKESTWETYSSWQSKNFTKLYLDS	600
An453	QSLDFTDMMNLWLSHKLYGVENNAKELLPDILVQNNTKESTWETYSSWQSKNFTKLYLDS	600
An63	DSLSAQKKEKQILEFSDHLPEATFKHYQANINSWKEDILAPTSPKLQNNRLIILTSEPLKH	660
An453	DSLSEQKKEKQILEFSDYLPPEATFKHYQTNNINSWKEDILALTSPKLEDNRLIILTSEPLKH	660
An63	EILLKGVAIKIKLITSQLDHGLISVKLVVDYGDAKRLGATPTILERRGLDLGYHWQEDNLV	720
An453	ETLLKGVAIKIKLIASQLDHGLVSVKLVVDYGDAKRLGATPTILERRGLDLGYHWQEDNLV	720

An63	EFKFLAKETPFKMVTQAHNLNQRHNNFSTDELEANKFYDVEITTQPMFYHLPKGHKLGVLV	780
An453	EFKFLTKETPFKMVTQAHNLNQRHNNFNADELEANKFYDVEITTQPMFYHLPKGHKLGVLV	780
An63	IYATDMEMTLQGNEENSRYRIDTTGSYCLLP IEE	813
An453	IYATDMEMTLQGNEENSRYRIDTAGSYCLLP IEE	812

Obrázek 4: Porovnání aminokyselinové sekvence mezi kmeny An63 a An453. Změna v sekvenci je zaznačena žlutě, celkem sekvence obsahuje 43 změn.

An63	MVINILKERIVIMKFNQFAHVKVPFEQKLAELNRIAF LHAGDEDLASNH IYRLF LERAFP	60
ZLS006	-----MKFNQFAHVKVPFEQKLAELNRIAF LHAGDEDLASNH IYRLF LERAFP	48
An63	NFKTEAAKNHALSNLAATEN D I LTYLNSSKINARVFYAVGLQLLGFEAE LDFDLKDPFS	120
ZLS006	NFKTEAAKNHALSNLAATENADVLTYLNSSKINARVFYAVGLQLLGFEAD LDFY LKDPFS	108
An63	TMDKLNLPYQKEINHPNDVINAWYDLLCTSTKKGQTLLDILANRGYFTQFYKLNLAEP I F	180
ZLS006	AMDKLNLPYQKEINHRDDVINAWYDLLCTSTKKGQNLLDILANRGYFTQFYQLNLTEP I F	168
An63	FNGKAQPVFDTSKLIHEVVYVESELDTDHDDKRDLLKVIITRPAVTDKGMKVPTIFTASP	240
ZLS006	FNGKAQPVFDTNKL IHEVVYVESELDTDQDKRDLLKVIITRPA MTDNGMKVPTIFTASP	228
An63	YYLGTNDASAEKMMHSVDLP I KRKEVKHLSYQDIEYHKPATKLPKKRPVVISTKNAEESW	300
ZLS006	YYLGTNDASAEKMMHSVYLP I KRKDVNQLSYQDIEYHKPATKLPKKRPVVISTKNAEESW	288
An63	EHLFTYTFNDYMLARGFAVVYSGGVGTLDSDGYRTCGDEAETLGAKDVVEWLN GKRTAFT	360
ZLS006	EHLFTYTFNDYMLARGFAVVYSGGVGTLDSDGYRTCGDEAETLGAKDVVEWLN GKRTAFT	348
An63	TKEANKAIPAWWSNGKVAMTGKSYLGT LATATATTGVEGLET I VSEAAISSWYDYREGG	420
ZLS006	TKEANKAIPAWWSNGKVAMTGKSYLGT LATATATTGVEGLET I I SEAAISSWYDYREGG	408
An63	LVIAPGGFPGEDADILAEECF SRQKCAGDYNRARDGFNKFLSTITIKDQDRITGNYNTFWD	480
ZLS006	LVIAPGGFPGEDADILAEECF SRQKSAGDYNRVK DGFNNFLSTITIR DQDRITGNYNTFWD	468
An63	ARNYLKDVGNIKCDVVMVHGLNDWNVVKLNKVFNLYNKLG D I EVTKKLILHQGQH IYINN F	540
ZLS006	ARNYLKDVGNIKCD I VMVHGLNDWNVVKLNKVFNLYNKLG D I EVTKKLILHQGQH IYINN F	528
An63	QSLDFTDMMNWLWSHKLYGVENNAKELLPDILVQNNTKESTWETYSSWQSKNFTKLYLDS	600
ZLS006	QSLDFTDMMNWLWSHKLYGVKNNAKESLPDILVQNNTKESTWETYSSWQSKNFTKLYLDS	588
An63	DSLSAQKKE SQTLEFS D H LPEATFKHYQANINSWKEDILAPTSPKLQNNRL I I TSEPLKH	660
ZLS006	DSLSAQKKE NQTLEFS D H LPEATFKHYQVNINSWKEDILAPTSPKLENNRL I I TSEPLKH	648
An63	E I L L K G V A K I K L K I T S Q L D H G L I S V K L V D Y G D A K R L G A T P T I L E R R G L D L G Y H W Q E D N L V	720
ZLS006	E T L L K G V A K I K L K I A S Q L D H G L V S V K L V D Y G D A K R L G A T P T I L E R R G L D L G Y H W Q E D N L V	708
An63	EFKLAKETPFKMVTQAHNLNQRHNNFSTDELEANKFYDVEITTQPMFYHLPKGHKLGVLV	780
ZLS006	EFKLAKETPFKM I TQAHNLNQRHNNFSTDELEANKFYDVEITTQPMFYHLPKGHKLGVLV	768
An63	IYATDMEMTLQGNEENSRYRIDTTGSYCLLP IEE	813
ZLS006	IYATDMEMTLQGNEENSRYRIDTAGSYCLLP IEE	801

Obrázek 5: Porovnání sekvence enzymu X-prolyl dipeptidyl aminopeptidázy u kmenů An63 a ZLS006. Z vyznačených změn můžeme pozorovat 40 záměn.

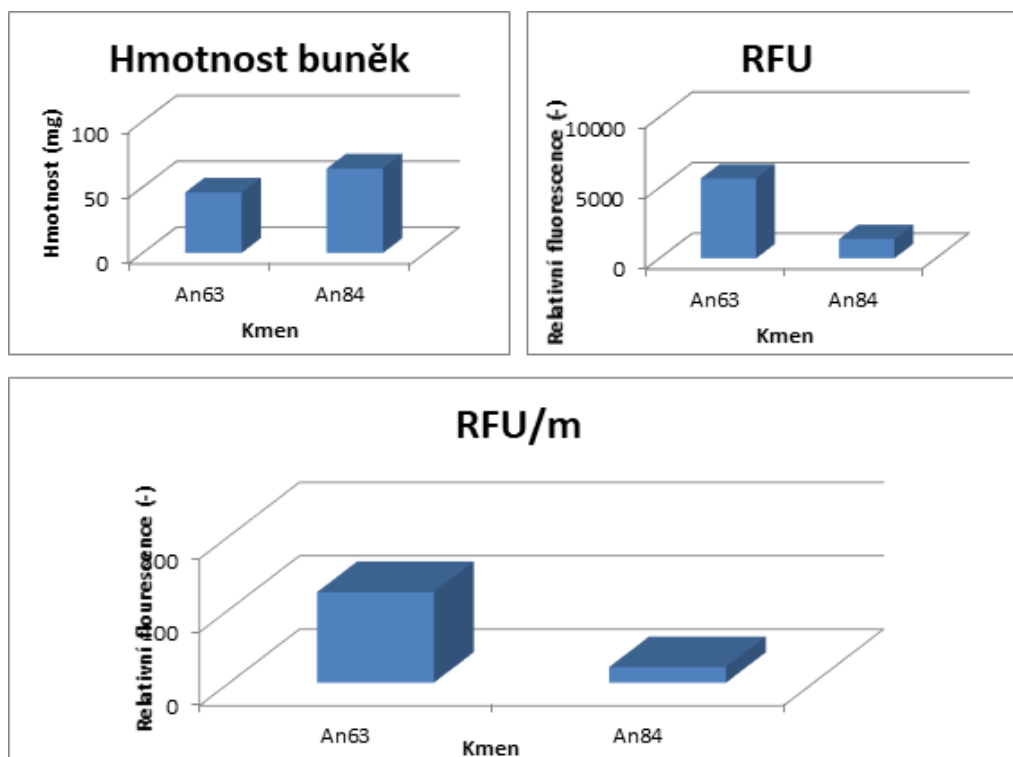
Tvorba lyzátu

K měření aktivity byly použity bakteriální lyzáty, připravené z 5 ml narostlé kultury. Ta byla stočena, a k ní byl přidán lysozym (o výsledné koncentraci 0,1 mg/ml) a 1,5 ml TRIS-HCl pufru (0,1M, pH=8). Buňky byly následně sonikovány (celkový čas 5 minut, pulz 1s, amplituda 35%). Po sonikaci byly vzorky centrifugovány (14 000 g, 20 minut, 4°C) a k dalšímu měření byl používán supernatant.

Měření enzymové aktivity

Jako substráty byly použity fluorescenční substráty KP-AMC a GP-AMC. K samotnému měření aktivity bylo do 96ti jamkové destičky smícháno 15 µl lyzátu s 35 µl pufru, následovala inkubace 15 min při

37°C. Poté bylo ke vzorkům přidáno 50 µl roztoku, který obsahoval 48 µl pufru, 1 µl 1% PEGu a 1 µl substrátu o c= 10 µM. Měření aktivity probíhalo 60 min při vlnové délce 453 nm.



Obrázek 3: Grafy znázorňují výsledky aktivního měření. Hmotnost buněk byla brána jako hmotnost buněk po nárůstu, které byly stočeny. Relativní fluorescence (RFU) byla měřena za použití umělého substrátu. Dále byla hodnota fluorescence přepočítána na jednotku buněčné hmoty. Přestože měl kmen An84 vyšší nárůst a tím vyšší hmotnost buněčné hmoty, fluorescence byla nižší než u kmene An63.

Analýza rezistence k antibiotikům

S ohledem na bezpečnost použití lyzátu dané bakterie, byla stanovena rezistence k antibiotikům. Animální kmen *Lactobacillus salivarius* An63, který vykazuje nejlepší výsledky v aktivním měření, se také vyznačuje nejmenší antibiotickou rezistencí mezi testovanými kmeny.

Antibiotikum	An63 MIC (mg/ml)		An84 MIC (mg/ml)	
ampicilin	2	2	2	2
tetracyklin	4	4	64	64
ciprofloxacin	2	2	1	1
chloramfenikol	4	4	4	4
erytromycin	0,125	0,125	0,125	0,125
klinamycin	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125
gentamicin	4	4	8	8
streptomycin	64	64	64	128
neomycin	4	4	4	8
vankomycin	>64	>64	>64	>64
tiamulin	32	32	<1	<1
rifampicin	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
PKR	+	+	+	+

Tabulka 2: Výsledky testů antibiotické rezistence. Zelená barva značí hodnoty MIC nižší než epidemiologická hranice (citlivé) dle EFSA. Modrá barva vyjadřuje, že hodnoty MIC se rovnají epidemiologická hranice dle EFSA. Oranžová barva znamená, že hodnoty MIC vyšší než epidemiologická hranice dle EFSA. Červeně je zvýrazněna hodnota znamenající rezistentní dle breakpointu EUCAST (Vankomycin - citlivý kmen do MIC ≤ 2 mg/l).

4. Srovnání novosti postupů

Na trhu existuje celá řada enzymových přípravků, které obsahují směs enzymů z různých organismů. Přípravek Gluten Prima obsahuje kromě neutrální proteázy i amylázu a glukaoamylázu, která by měla pomoci natrávit bílé pečivo. Přípravek Gluten Digest obsahuje řadu proteáz z různých plísní rodu *Aspergillus*, včetně amylázy a glukaoamylázy. Přípravek Lepek Fit je založen na enzymech z papáje včetně papainu, což je cysteinová proteáza se širokou substrátovou specifitou včetně klíčové dipeptidyl peptidázové aktivity, která štěpí lepkové peptidy „prolaminy“. V USA se prodává produkt s názvem GliadinX, což je enzym Prolyl Endopeptidáza z *Aspergillus niger*, která by měla účinně štěpit α -gliadiny. V Austrálii se prodává výrobek GlutenGuard, který obsahuje kromě papainu i chymopapain a caricain, což jsou papainu podobné cysteinové proteázy. V současné době je v USA klinicky zkoušen výrobek KumaMax, což je rekombinantně upravený enzym kumamolysin z acidofilní bakterie *Alicyclobacillus sendaiensis* schopný trávit glutenové proteiny v kyselém prostředí žaludku.

Kmen *Lactobacillus salivarius* An63 má mezi dostupnými probiotickými kmeny nejvyšší X-prolyl dipeptidyl aminopeptidázovou aktivitu. Tento kmen by měl sloužit jako referenční kmen pro výběr humanizovaných kmenů *Lactobacillus salivarius* při výběru a testování z hlediska schopnosti štěpit prolamínové peptidy.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Vzhledem k tomu, že jedinou možnou léčbou celiakie je celoživotní bezlepková dieta, tento koncept řešení štěpení toxických prolamínových peptidů by mohl být alternativou bezlepkové diety. Kromě bezpečnosti a účinnosti je potřeba prokázat formu (lysát/živá bakterie) a dávku, která by byla účinná při eliminaci prolamínových peptidů.

6. Ekonomické aspekty

Funkční vzorek „Probiotický lysát snižující množství imunotoxických prolamínů“ by mohl sloužit jako referenční vzor při vývoji produktu na bázi nápoje, jogurtu, syrovátkového nápoje nebo doplňku stravy, který bude obsahovat unikátní probiotické bakterie schopné štěpit lepkové peptidy a tím snižovat množství těchto imunotoxických bílkovin ve střevě uživatele. Tento koncept bude nabízen firmám, které se zabývají výrobou nealkoholických nápojů a potravinových doplňků a jejich prodejem v rámci České republiky, ale i v rámci středoevropského regionu respektive v rámci EU.

Celosvětový trh bezlepkových výrobků byl oceněn na 3 126 milionů dolarů a očekává se, že bude do roku 2022 svědkem stálého růstu, který dosáhne 5 279 milionů USD, přičemž se zvýší až o 7,5 %. Většina bezlepkových potravin je zdravých a pomáhá při hubnutí se správnými kombinacemi a proporcemi jiných potravin. Očekává se, že nárůst počtu pacientů s celiakií a intolerance lepku spolu s faktory jako je podpora zdraví a wellness, zlepšení marketingových aktivit, zvýšení povědomí o celiakii a další glutenových alergií v blízké budoucnosti podpoří růst trhu. Finanční náročnost bezlepkové diety spolu s určitým diskomfortem spojeným se stálým sledováním potravin, zda obsahují lepek, povede ke zvýšené potřebě nalézt alternativu bezlepkové diety.

Funkční vzorek „Probiotický lysát snižující množství imunotoxických prolamínů“ by mohl sloužit k vývoji produktu, který by pacientům, ale i zájemcům z řad sportovců a lidí dbajících na zdravou výživu mohl přinést tuto žádanou alternativu.

7. Seznam použité literatury

1. **Sonnenburg J.L., Sonnenburg E.D.** Vulnerability of the industrialized microbiota. *Science*. 2019; 366 (6464): eaaw9255. DOI: 10.1126/science.aaw9255
2. **Kerry R.G., Patra J.K., Gouda S., Park Y., Shin HS., Das G.** Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2018; 26: 927 – 939.
3. **Food and Agriculture Organization and World Health Organization Expert Consultation.** Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization; 2001.
4. **Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health.** Edited by Rao V., Rao L. IntechOpen. 2016. ISBN-13: 978-9535124757
5. **Derrien, M., van Hylckama Vlieg, J.E.T.** Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in Microbiology*. 2015, 23(6). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.002>
6. **Bystroň J.** Využití bakteriálních lyzátů v klinické praxi. *Pediatric pro praxi*. 2011; 12 (6): 398-404.
7. **Neville BA, O'Toole PW.** Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* and closely related *Lactobacillus* species. *Future Microbiology*. 2010;5(5):759-74. doi:10.2217/fmb.10.35.
8. **Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony L, O'Halloran S, Feeney M, Morrissey D, Thornton G, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, Quigley EM, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK.** Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1999; 76: 279–292.
9. **Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK.** In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001;73(2): 386–392.
10. **Raftis EJ, Salvetti E, Torriani S, Felis GE, O'Toole PW.** Genomic Diversity of *Lactobacillus salivarius*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(3):954-965. doi:10.1128/AEM.01687-10.
11. **Shan L, Molberg, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C.** Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue. *Science*. 2002; 297 (5990): 2275 – 2279. Doi:10.1126/science.1074129
12. **Tye-Din JA, Stewart JA, Dromey JA, Beissbarth T, van Heel DA, Tatham A, Anderson RP et. al.** Comprehensive, Quantitative Mapping of T Cell Epitopes in Gluten in Celiac Disease. *Science Translational Medicine*. 2010; 2(41): 41ra51–41ra51. doi:10.1126/scitranslmed.3001012

8. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu TAČR GAMA TG03010038.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz