

Název: *Lactobacillus* stimuluje odolnost k viru chřipky

Školitel: Zuzana Lacková, Mgr. et Bc. Markéta Komínková, Mgr. Ondřej Zítka, Ph.D

Datum: 28. 3. 2014

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148

Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti "in vivo" zobrazovacích technik



Rod *Lactobacillus*

- Grampozitivní, fakultativně anaerobní či mikroaerofilní bakterie
- Součást přirozené mikroflóry (zažívací trakt, vagína)
- Využití v potravinářství (fermentované mléčné výrobky)
- Využití v farmaceutickém průmyslu (probiotika, výroba vitamínů)
- Účinky:
 - Posiluje imunitní systém
 - Inhibuje střevní patogeny
 - Snižuje hladinu cholesterolu v krvi
 - Snižuje oxidační stres
 - **Zmírňuje příznaky chřipky**
 - **Ochrana před virovými respiračními onemocněními**

Glutathion

- Tripeptid
- Antioxidační účinky
- Ochrana proti ROS, těžkým kovům, xenobiotikům
- Udržuje redoxní rovnováhu buněk

- Výskyt:
 - V eukaryotických systémech a gramnegativních bakteriích
 - U grampozitivních ?

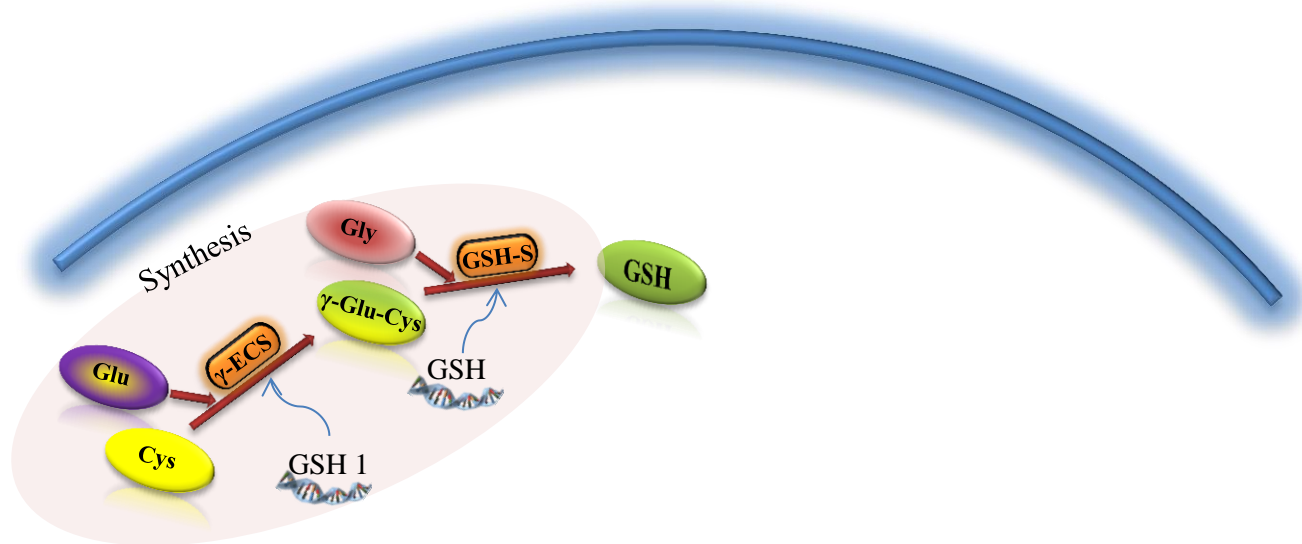
G+ bakterie a glutathion

- Glutathion obsahují jen některé G+
 - Syntéza glutathion (*Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Clostridium perfringens*, ...)
 - Gopal, S.; Borovok, I.; Ofer, A.; Yanku, M.; Cohen, G.; Goebel, W.; Kreft, E.; Aharonowitz, Y., A multidomain fusion protein in *Listeria monocytogenes* catalyzes the two primary activities for glutathione biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 2005, 187, 3839-3847.
 - Import z média (*Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, ...)
 - Pophaly, S. D.; Singh, R.; Kaushik, J. K.; Tomar, S. K., Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories* 2012, 11.

Glutathion – syntéza a degradace



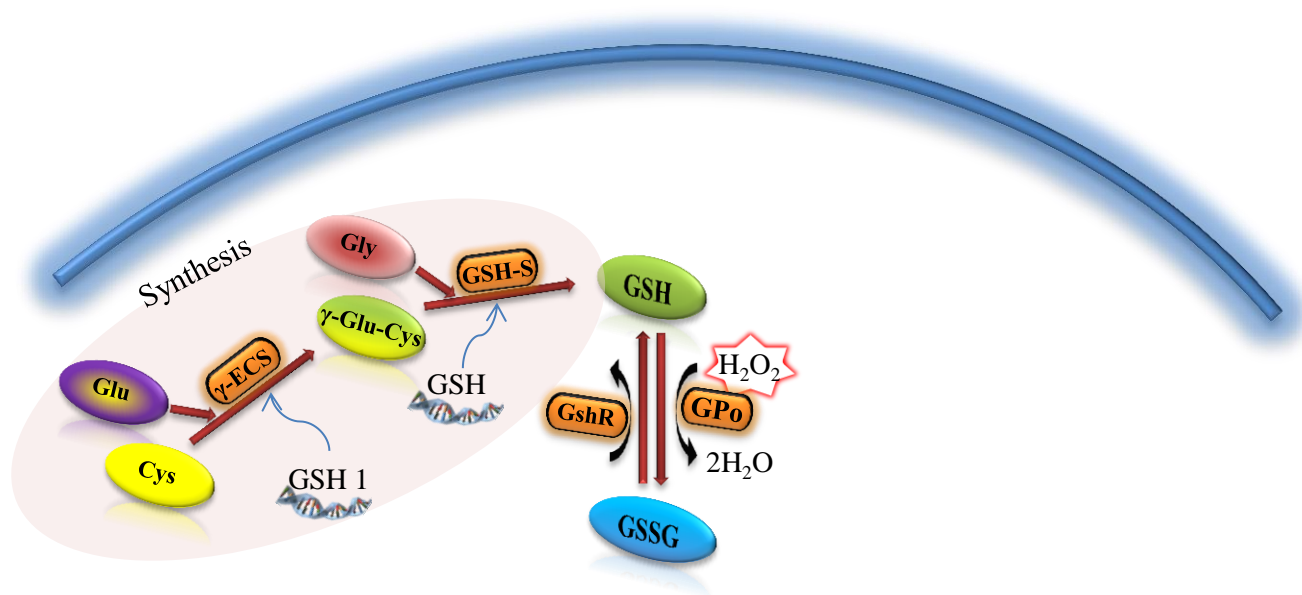
Glutathion – syntéza a degradace



γ -ECS - γ -glutamylcystein syntáza
GSH-S - glutation syntáza

Glu – kyselina glutamová
Cys – cystein
Gyl – glycin

Glutathion – syntéza a degradace



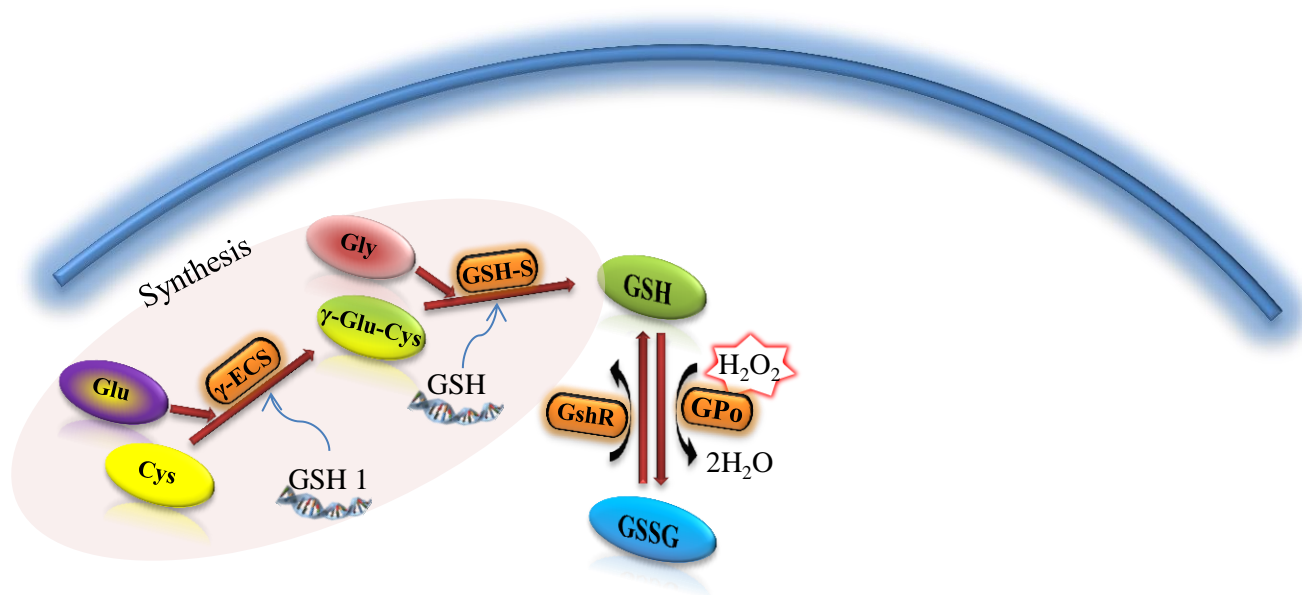
GshR - glutation reduktáza

GPO - glutation peroxidáza

GSH – redukovaný glutathion

GSSG – oxidovaný glutathion

Glutathion – syntéza a degradace

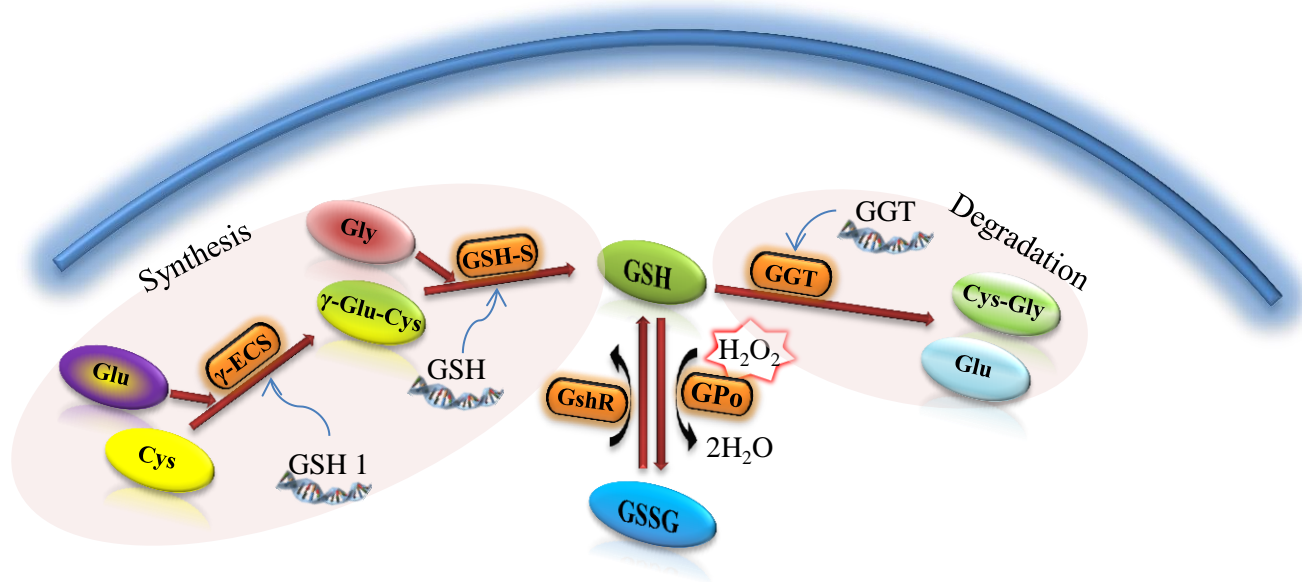


GshR - glutation reduktáza

GPo - glutation peroxidáza

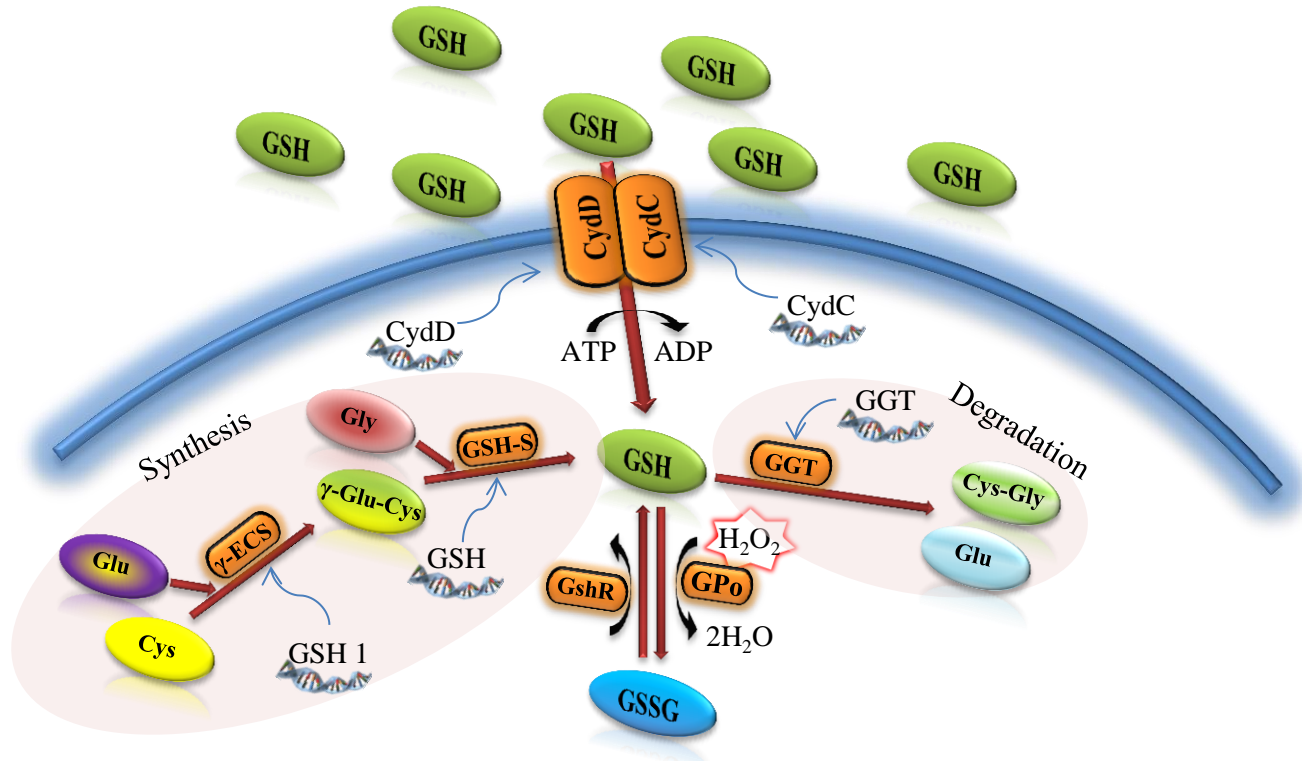
Základ antioxidačních vlastností glutathionu

Glutathion – syntéza a degradace



GGT - γ -glutamyl transpeptidáza

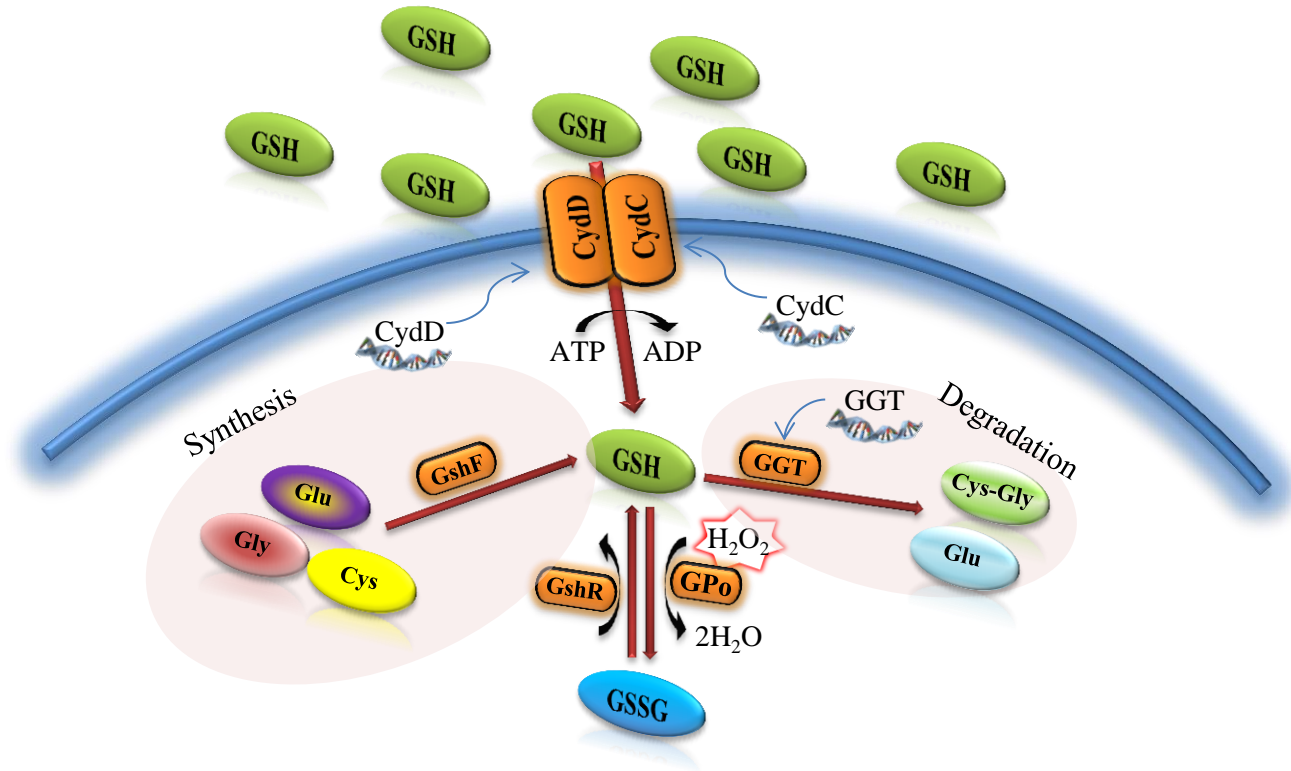
Glutathion – syntéza a degradace



CydDC- fúzní proteiny

U prokaryot

Glutathion – syntéza a degradace



GshF- multidoménový protein

Některé G+

Lactobacillus rhamnosus

- Při orálním podání působí proti respiračním virovým patogenům
- Příznivě ovlivňuje léčbu respiračních onemocnění
- Posiluje specifické imunitní funkce
- Podporuje léčbu řady onemocnění

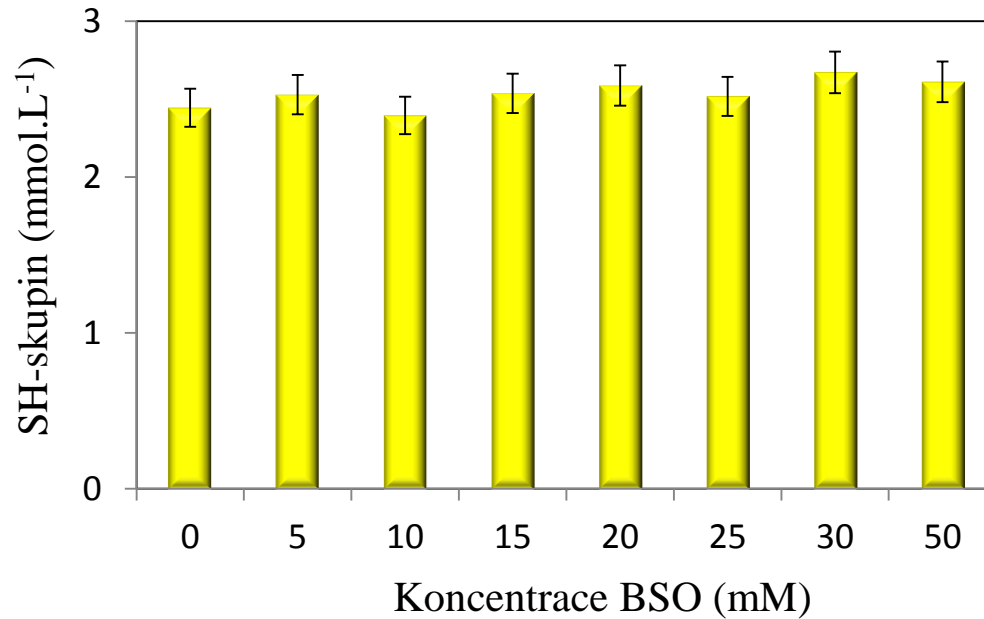
- Homology GshF
- Import z média
 - Pophaly, S. D.; Singh, R.; Kaushik, J. K.; Tomar, S. K., Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories* 2012, 11.

Cíl

- Stanovení koncentrace glutathionu v *L. rhamnosus* a blokace syntézy glutathionu pomocí buthionin sulfoximinu (BSO)
 - HPLC-ED, ellmanovo činidlo
- Vliv extracelulárního glutathionu na růst *L. rhamnosus*
 - růstové křivky
 - stanovení glukózy, celkového obsah proteinů, LDH, laktát
 - stanovení antioxidační aktivity

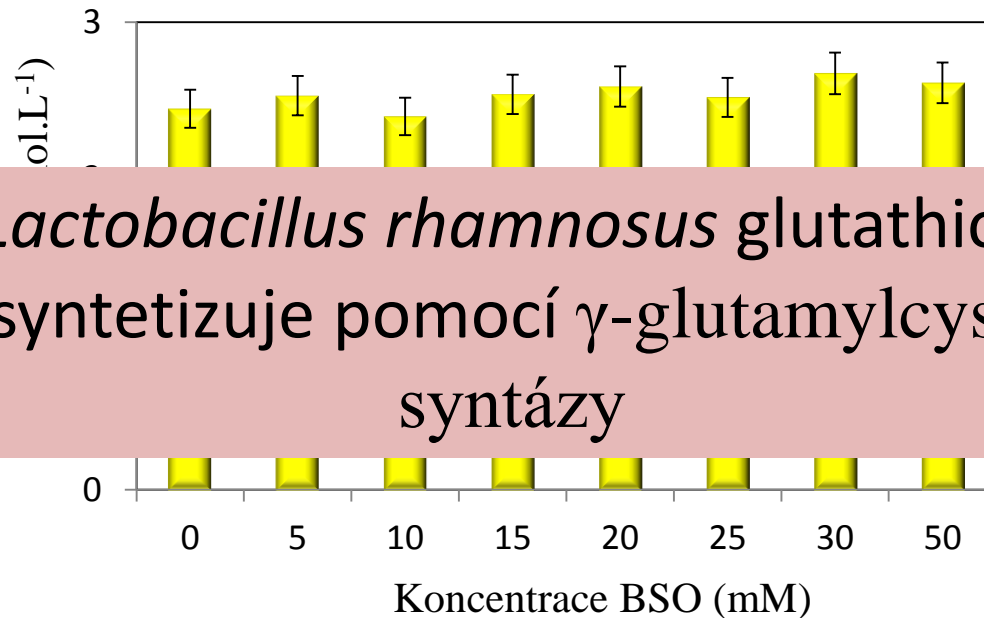
Glutathion

- Stanovení glutathinu pomocí Ellmanova činidla



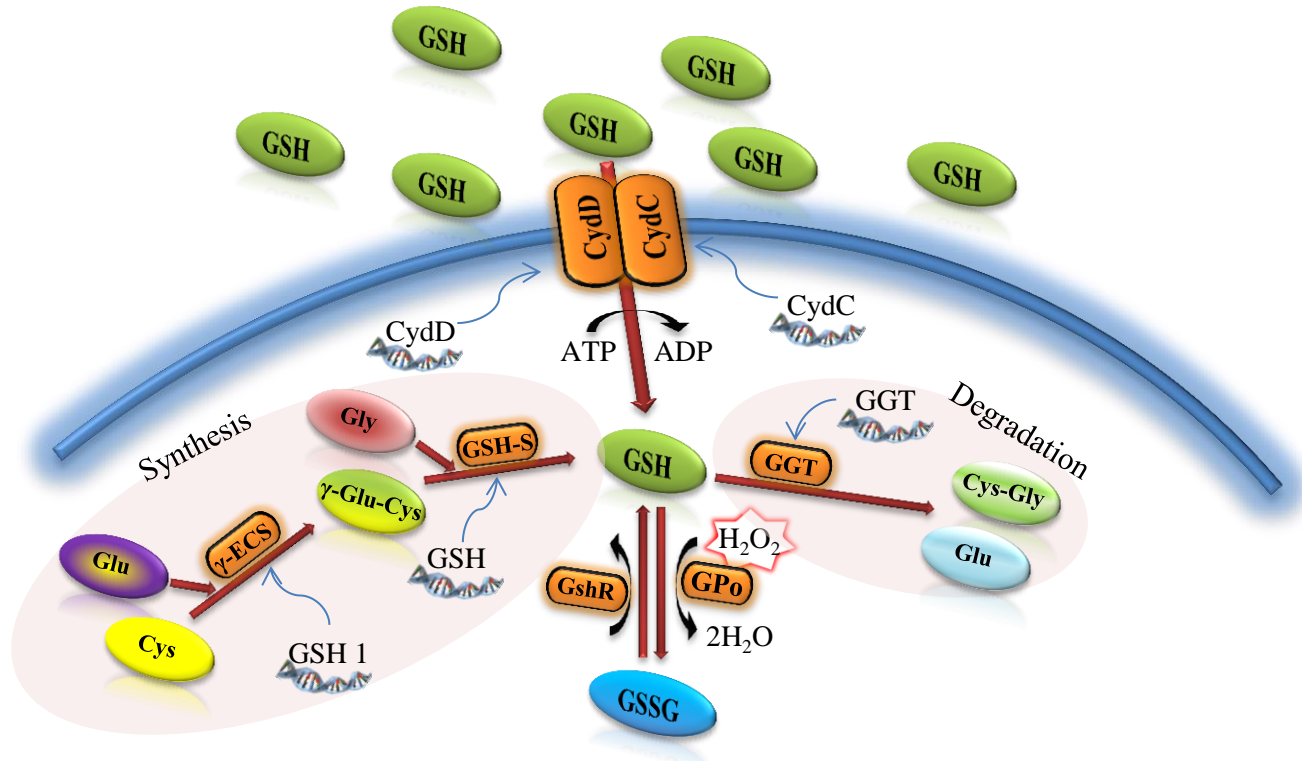
Glutathion

- Stanovení glutathinu pomocí Ellmanova činidla

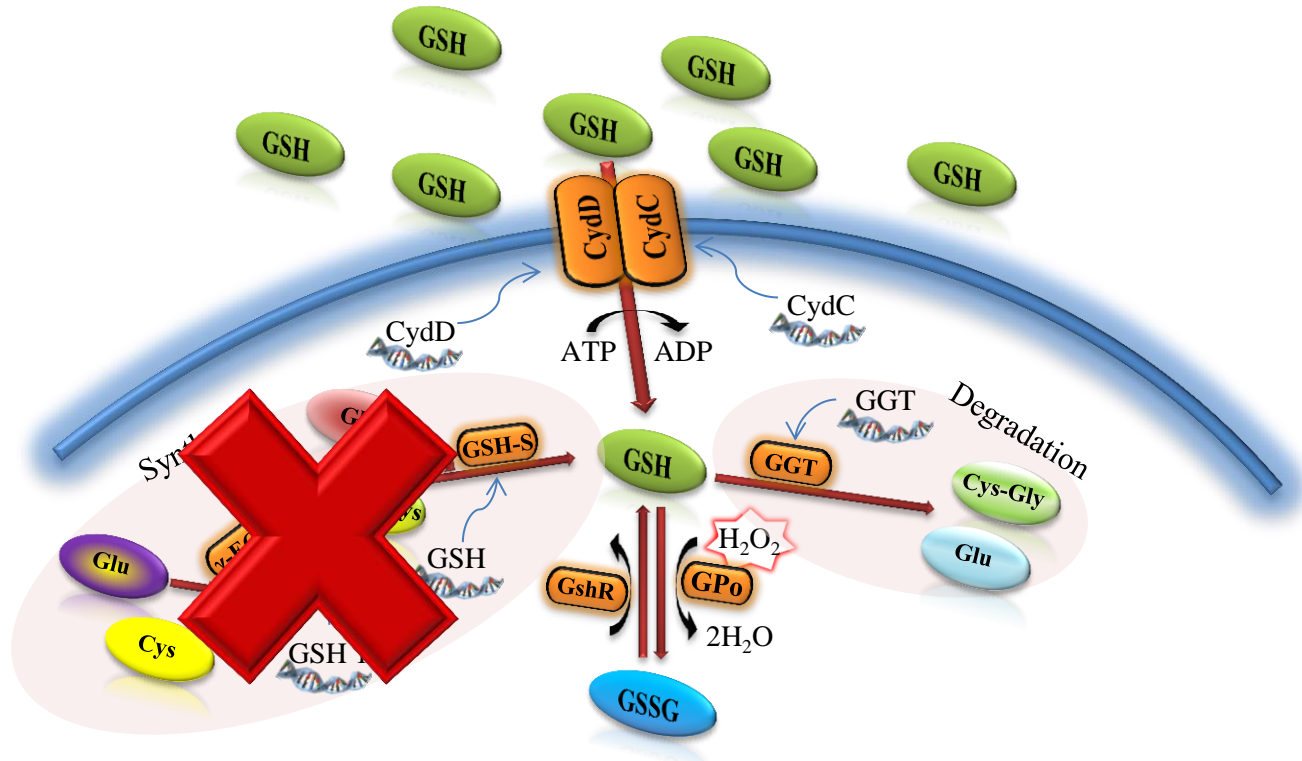


Lactobacillus rhamnosus glutathion
nesyntetizuje pomocí γ -glutamylcystein
syntázy

Glutathion – syntéza a degradace

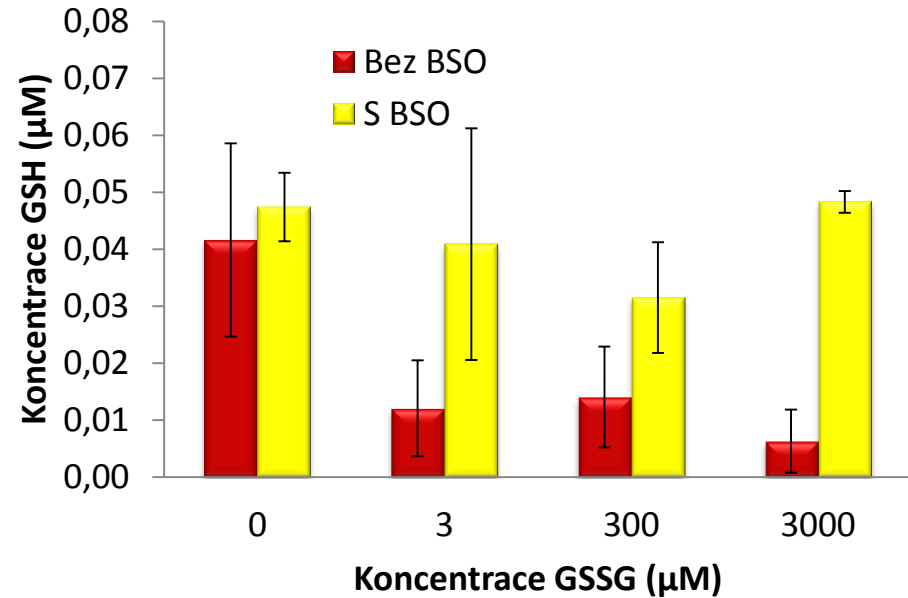
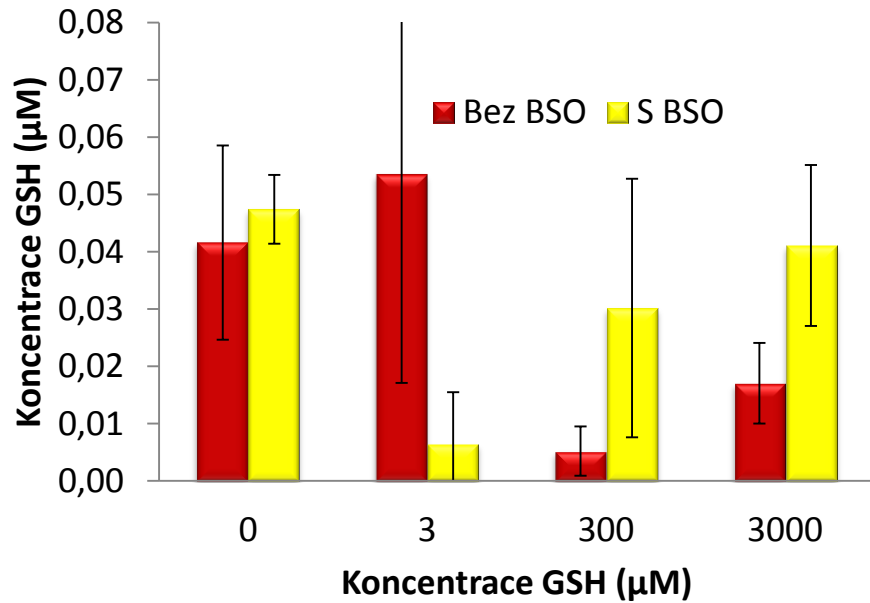


Glutathion – syntéza a degradace



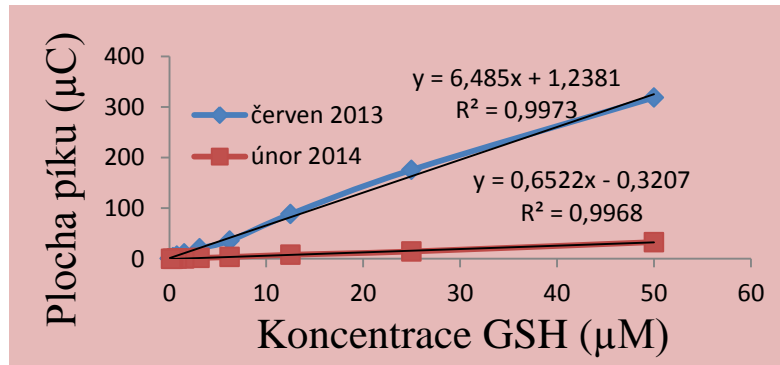
Glutathion

- Stanovení glutathinu pomocí HPLC-ED

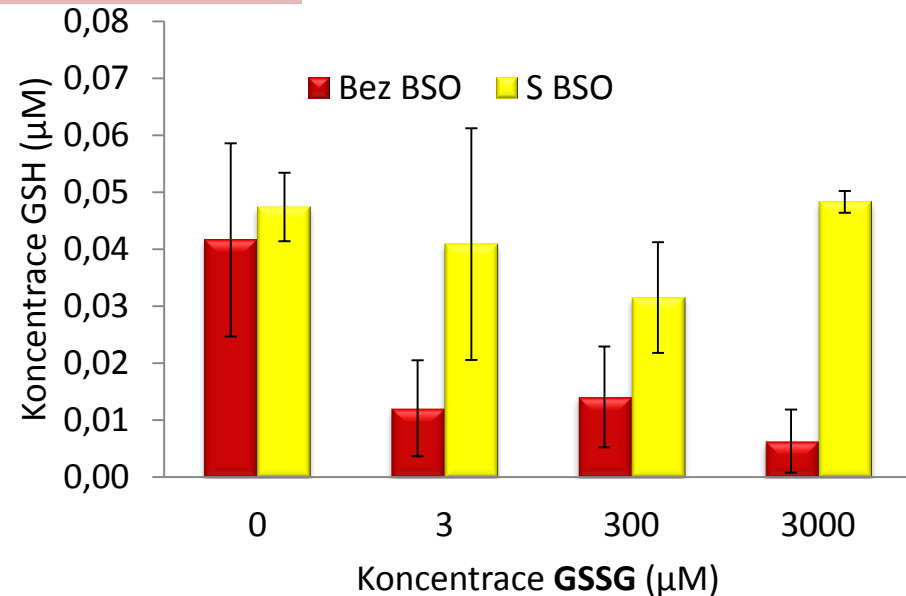
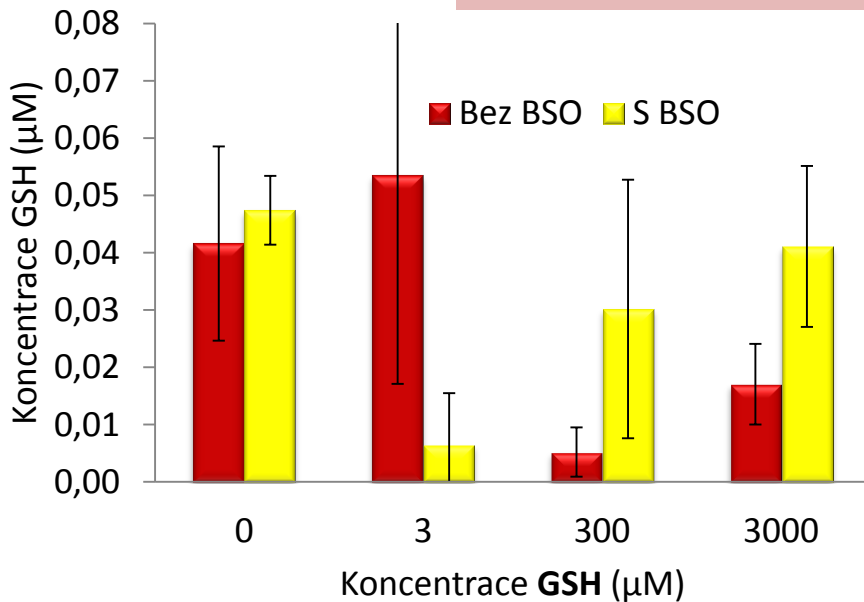


Glutathion

- Stanovení glutathinu pomocí HPLC-ED

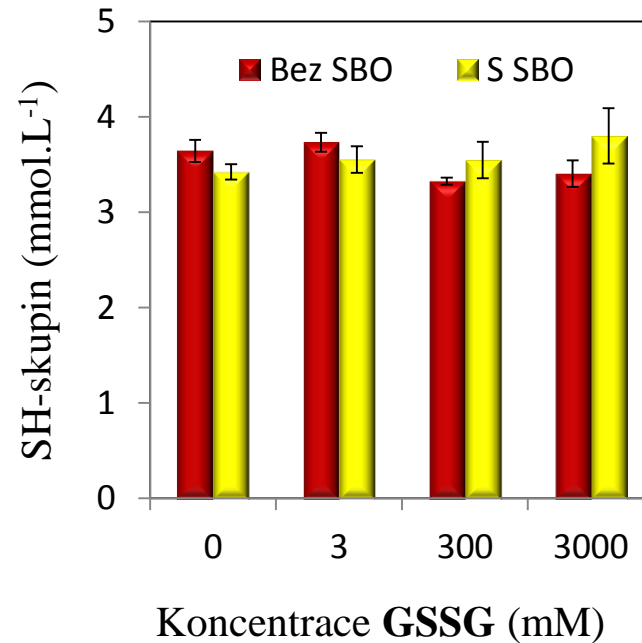
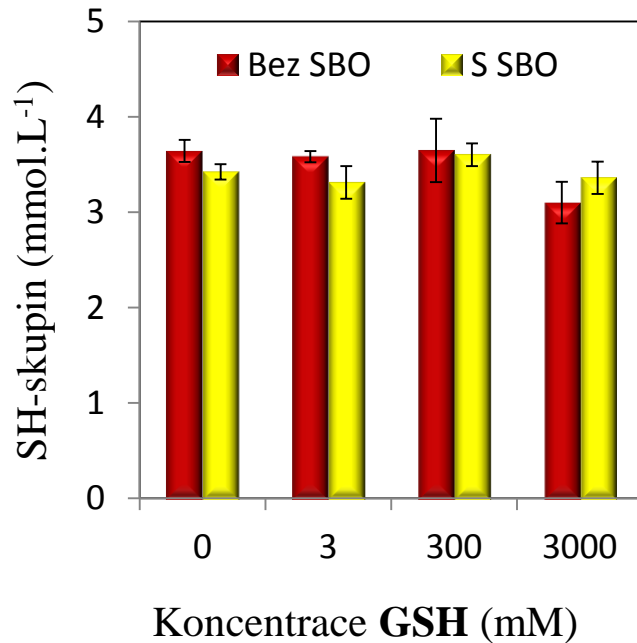


Červen 2013 LOD < 0.03 µM
 Únor 2014 **LOD < 0.3 µM**

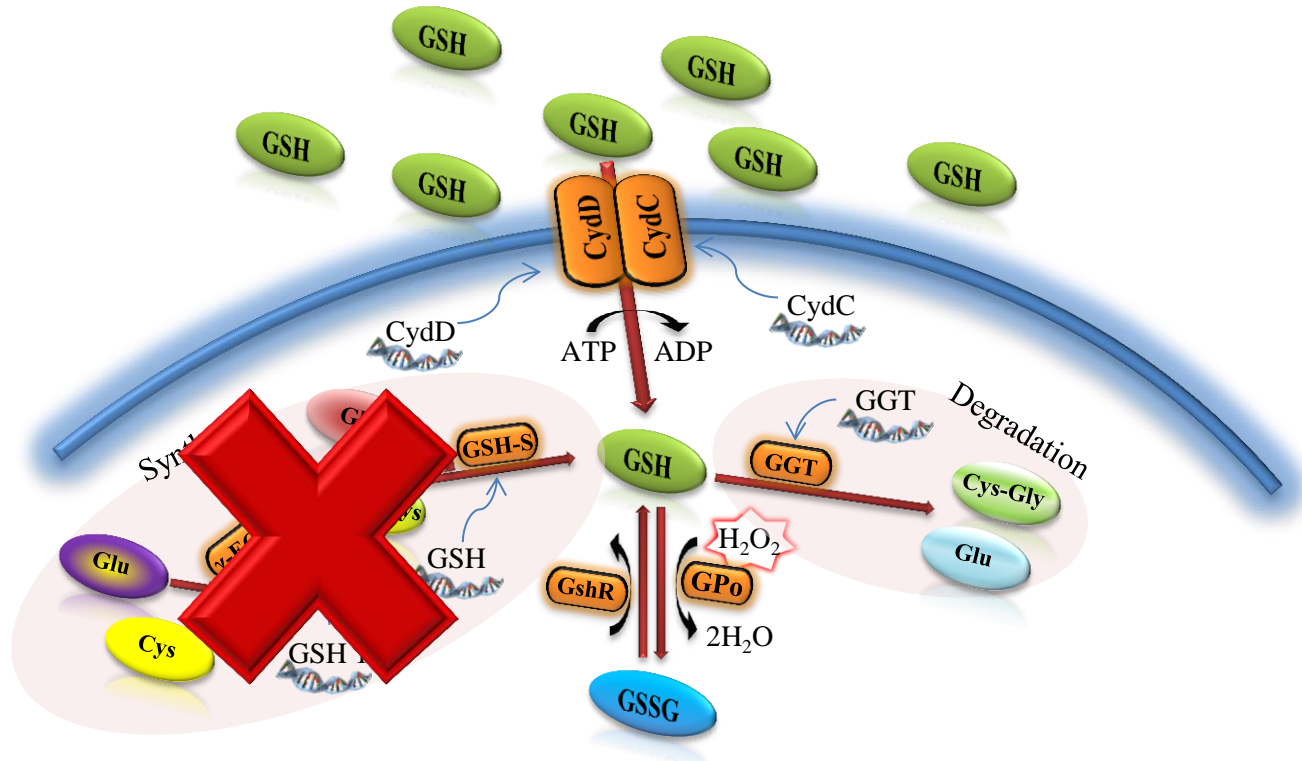


Glutathion

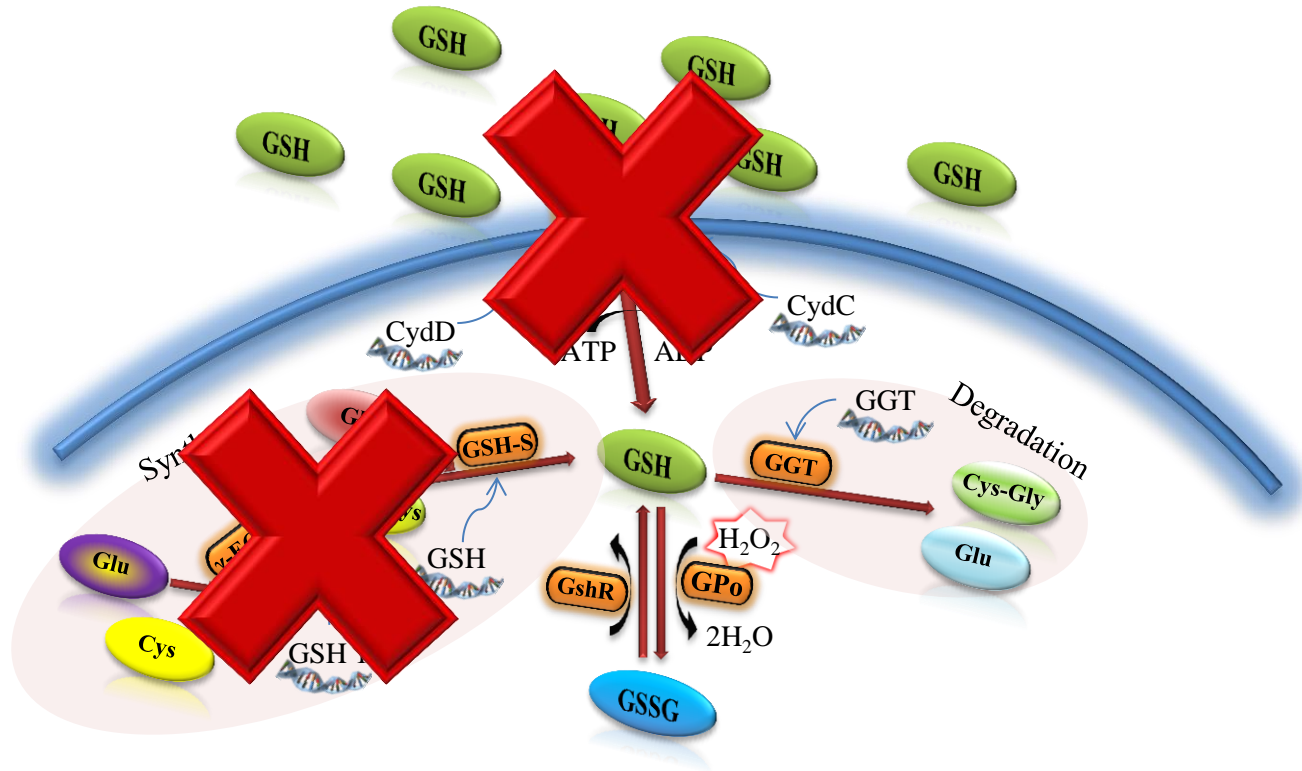
- Stanovení glutathinu pomocí Ellmanova činidla



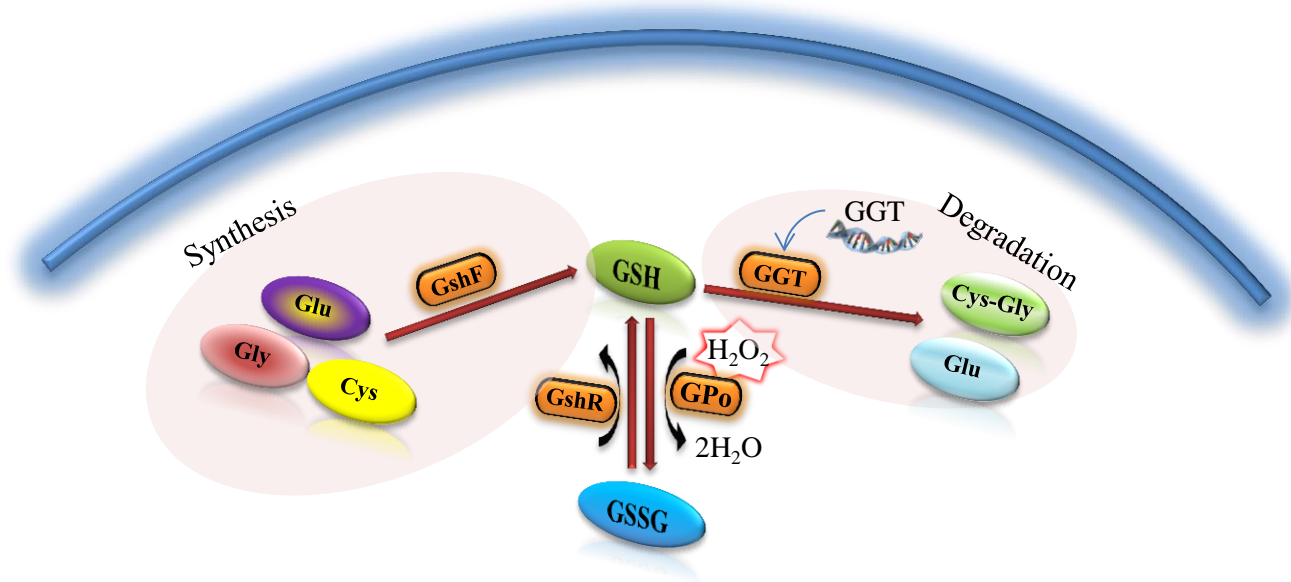
Glutathion – syntéza a degradace



Glutathion – syntéza a degradace

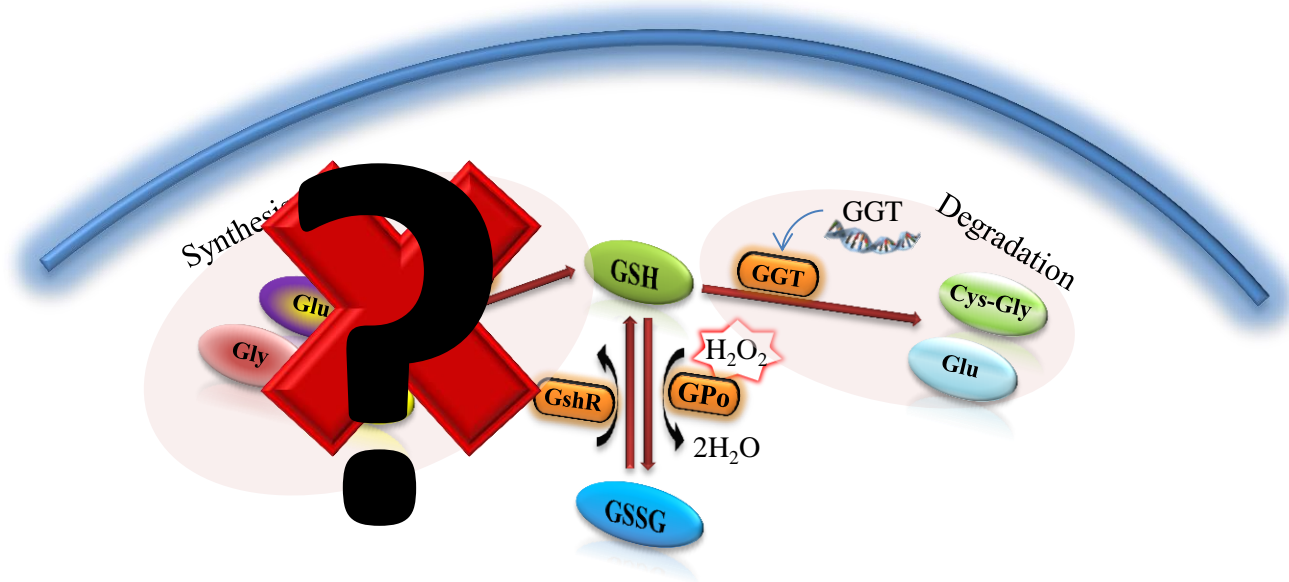


Glutathion – syntéza a degradace



GshF- multidoménový protein

Glutathion – syntéza a degradace

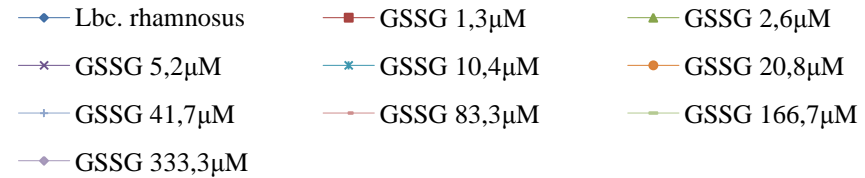
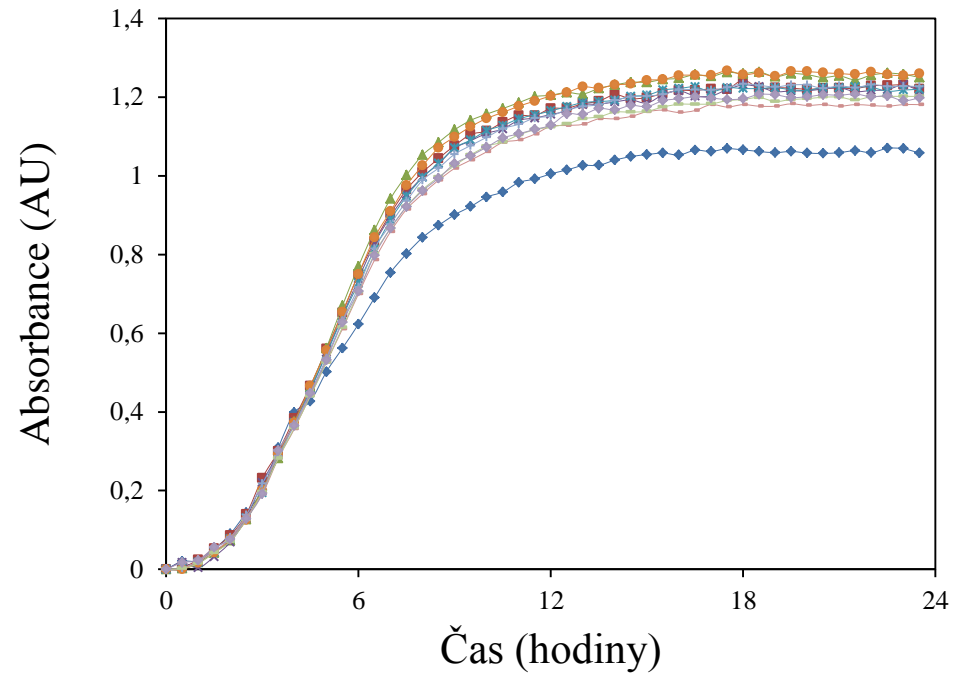
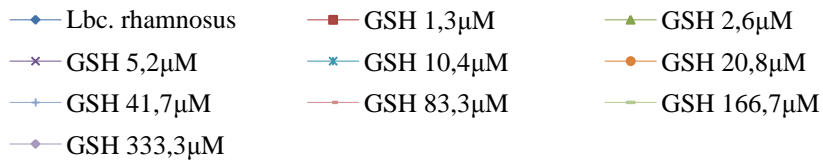
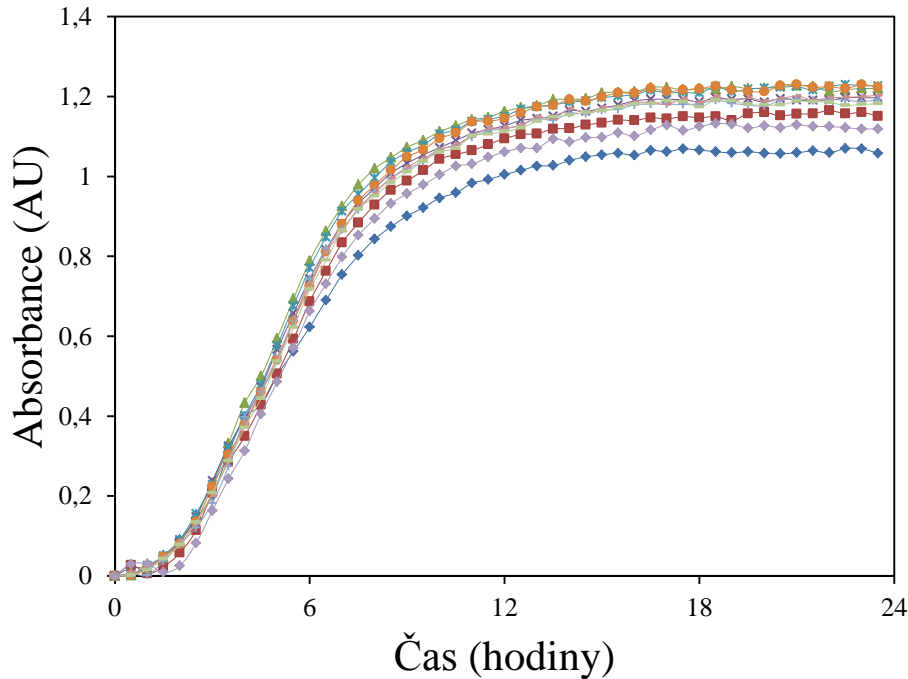


GshF- multidoménový protein

Jak glutathion působí na *L. rhamnosus*?

Jak glutathion působí na *L. rhamnosus*?

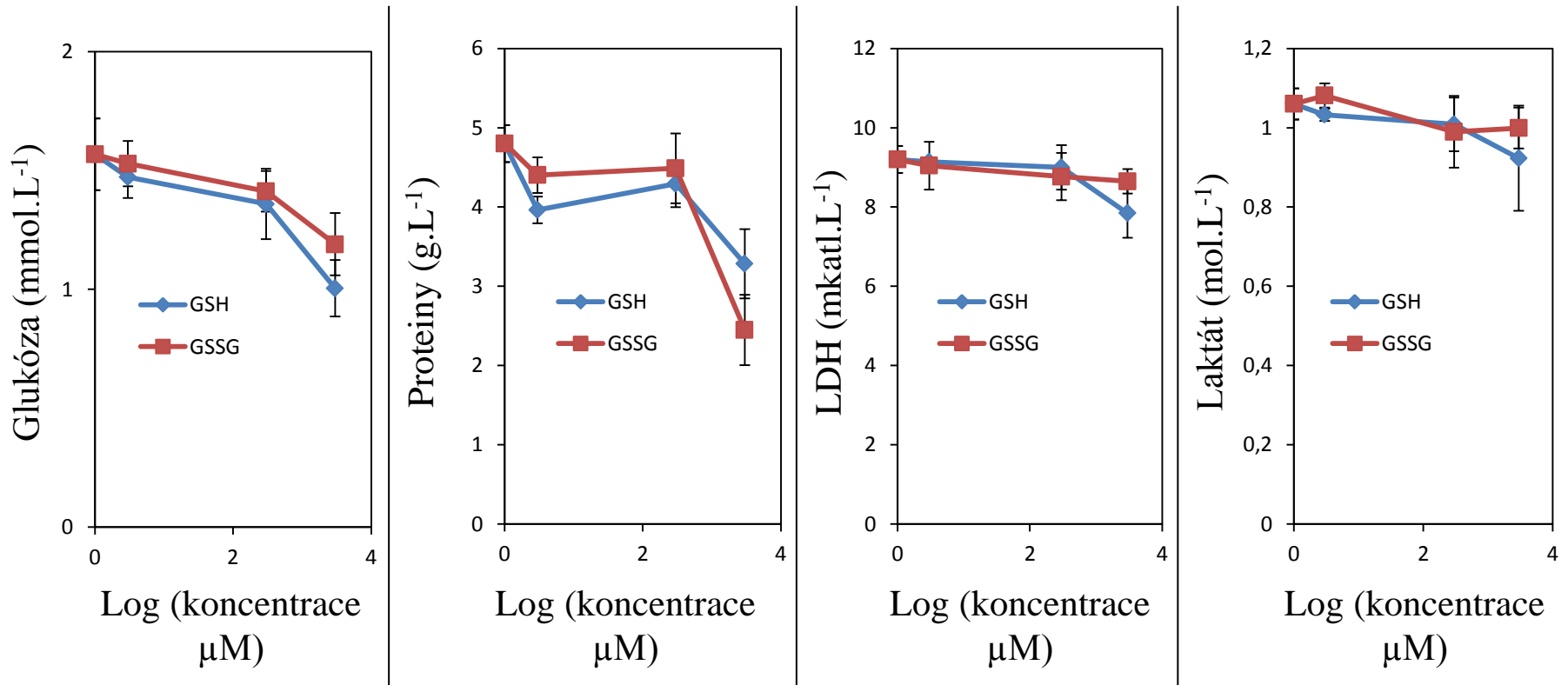
- Růstové křivky



Jak glutathion působí na *L. rhamnosus*?

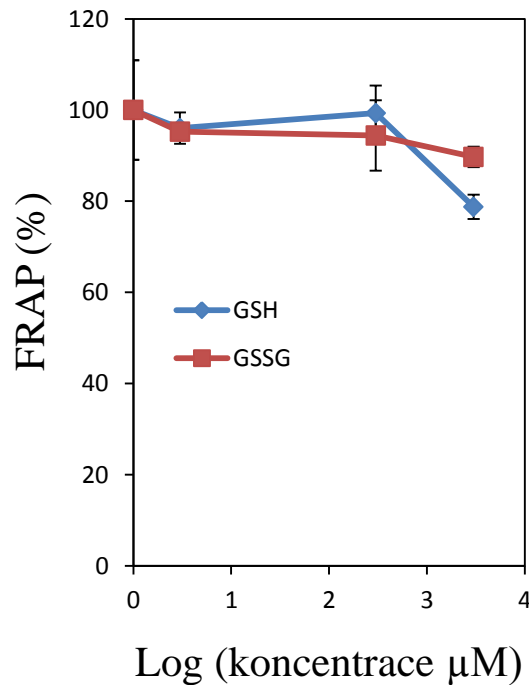
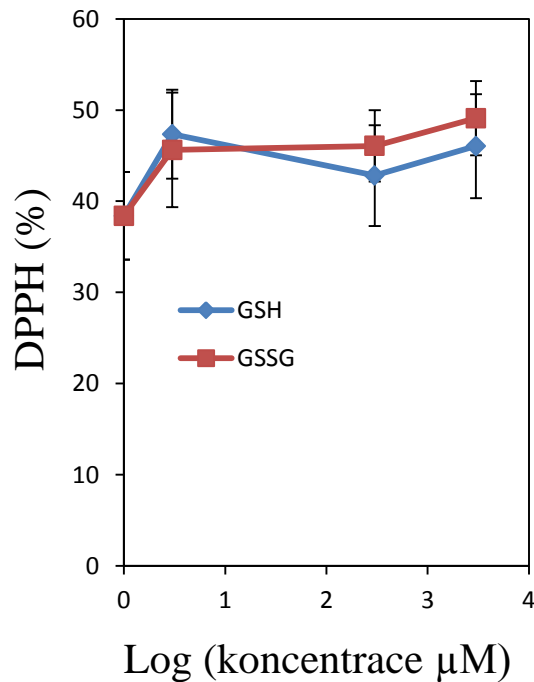
- Metabolismus

- Přídavek GSH a GSSG do média v koncentraci 0, 3, 300 a 3000 μM



Jak glutathion působí na *L. rhamnosus*?

- Antioxidační aktivita



Závěr

- *L. rhamnosus* neobsahuje γ -glutymylcystein syntázu
 - Pravděpodobně není schopen syntézy glutathionu
- *L. rhamnosus* neobsahuje fúzní proteiny
 - Není schopen importovat glutathion z média
- Glutathion urychluje metabolismus *L. rhamnosus*
- Glutathion nemá negativní vliv na *L. rhamnosus*

Výhled do budoucna

- Prostudování exprese genů zapojených do syntézy a transportu glutathionu do *L. rhamnosus*
- Podávání *L. rhamnosus* s přídatkem glutathionu myším infikovaným chřipkou
 - Sledování vlivu na příznaky a léčbu
- Aplikace na další virová onemocnění?

- Tato práce byla financována ze zdrojů NANOLABSYS CZ.1.07/2.3.00/20.0148



Literatura

- Meister, A.; Anderson, M. E., GLUTATHIONE. *Annual Review of Biochemistry* 1983, 52, 711-760.
- Knejzlik, Z.; Kas, J.; Ruml, T., Mechanism of xenobiotics entry into the organism and their detoxication. *Chemicke Listy* 2000, 94, 913-918.
- **Pophaly, S. D.; Singh, R.; Kaushik, J. K.; Tomar, S. K., Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories* 2012, 11.**
- Kullisaar, T.; Songisepp, E.; Aunapuu, M.; Kilk, K.; Arend, A.; Mikelsaar, M.; Rehema, A.; Zilmer, M., Complete Glutathione System in Probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2010, 46, 481-486.
- Masip, L.; Veeravalli, K.; Georgioui, G., The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxidants & Redox Signaling* 2006, 8, 753-762.
- Li, Y.; Hugenholtz, J.; Abee, T.; Molenaar, D., Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology* 2003, 69, 5739-5745.
- Collins, M. D.; Phillips, B. A.; Zanoni, P., DEOXYRIBONUCLEIC-ACID HOMOLOGY STUDIES OF *LACTOBACILLUS*-CASEI, *LACTOBACILLUS*-PARACASEI SP-NOV, SUBSP PARACASEI AND SUBSP TOLERANS, AND *LACTOBACILLUS*-RHAMNOSUS SP-NOV, COMB-NOV. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1989, 39, 105-108.
- Stiles, M. E.; Holzapfel, W. H., Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 1997, 36, 1-29.
- Gopal, S.; Borovok, I.; Ofer, A.; Yanku, M.; Cohen, G.; Goebel, W.; Kreft, E.; Aharonowitz, Y., A multidomain fusion protein in *Listeria monocytogenes* catalyzes the two primary activities for glutathione biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 2005, 187, 3839-3847.

Děkuji za pozornost

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148

Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti "in vivo" zobrazovacích technik

