

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Studijní program: Imunologie**



Autoreferát dizertační práce

**Vliv probiotických bakterií na alergickou senzibilizaci v modelu  
alergie I. typu**

**Mgr. Martin Schwarzer**

Nový Hrádek, 2013

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Program: Imunologie

Předseda oborové rady: Doc. RNDr. Vladimír Holář, DrSc.

Školící pracoviště: Laboratoř fyziologie, imunity a ontogeneze gnotobiontů,  
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.,  
Doly 183  
54922, Nový Hrádek

Autor: Mgr. Martin Schwarzer

Školitel: RNDr. Hana Kozáková, CSc.

Autoreferát dizertační práce byl poskytnut .....

Obhajoba dizertační práce se bude konat ..... v .....v konferenčním sále  
Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 14220, Praha 4-Krč.

S dizertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity  
Karlovy v Praze.

## OBSAH

<b>ZKRATKY</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>6</b>
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>8</b>
<b>3. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>9</b>
3.1 Bakteriální kmeny, testování a příprava .....	9
3.2 Konstrukce rekombinantního kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	9
3.3 Analýza produkce Bet v 1 .....	9
3.4 Příprava ovalbuminu (OVA), cirkulární dichroismus (CD) a enzymatické štěpení.....	9
3.5 Příprava a aktivace dendritických buněk odvozených z buněk kostní dřeně.....	10
3.6 Stimulace HEK293 buněk stabilně transfekovanými Toll-like receptory (TLR).....	10
3.7 Zvířata .....	10
3.8 Stabilita a testování bakteriálních kmenů v podmínkách <i>in vivo</i> .....	10
3.9 Schéma alergické senzibilizace.....	11
3.10 Buněčné kultury a stanovení cytokinů .....	11
3.11 Měření protilátkové imunitní odpovědi .....	11
3.12 Kvantitativní PCR.....	12
3.13 Průtoková cytometrie .....	12
3.14 Stanovení aktivity enzymů v kartáčovém lemu enterocytů .....	12
3.15 Statistická analýza.....	13
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>13</b>
<b>5. DISKUZE</b> .....	<b>16</b>
5.1 Výběr probiotických bakterií .....	16
5.2 Perinatální intervence probiotiky v prevenci alergické senzibilizace.....	17
5.3 Změna v alergenicitě antigenu po tepelné úpravě.....	18
<b>6. ZÁVĚRY</b> .....	<b>19</b>
<b>7. POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
<b>8. SEZNAM PUBLIKACÍ</b> .....	<b>22</b>
8.1 Publikace <i>in extenso</i> vztahující se k dané dizertační práci .....	22
8.2 Publikace <i>in extenso</i> nevztahující se k dané dizertační práci.....	22

## ZKRATKY

Alum	Hydroxid hliníku
BBMV	Membrána kartáčového lemu
Bet v 1	Hlavní březový pylový alergen
BM-DC	Dendritické buňky odvozené z buněk kostní dřeně
CD	Diferenciační antigen
CFU	Jednotka tvořící kolonie
DC	Dendritické buňky
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FAO/WHO	Potravní a zemědělská organizace/ Světová zdravotnická organizace
FoxP3	Forkhead box P3
GF	Bezmikrobní
HPLC	Vysokotlaká průtoková cytometrie
h-OVA	Vaječný albumin zahřátý na 70°C
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
LAB	Bakterie mléčného kvašení
LPS	Lipopolysacharid
MAPK	Mitogeny-aktivovaná protein kináza
MCPT-1	Proteáza žírných buněk 1
MLN	Mezenterální lymfatické uzliny
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe médium
MyD88	Myeloidní diferenciační faktor 88
NF- $\kappa$ B	Jaderný faktor kappa B
NOD	Oligomerizační doména vázající nukleotid
PRR	Receptor rozeznávající strukturu
TGF	Transformační růstový faktor
Th	Pomocný T lymfocyt
TLR	Receptory skupiny Toll
TNF	Faktor nekrotizující nádory
Treg	Regulační T lymfocyt

## ABSTRACT

The main goal in reversing the allergy epidemic is the development of effective prophylactic strategies. Early life events, such as exposures to microbes, have a major influence on the development of balanced immune responses. Due to their ability to interact with host immune system and to modulate host immune responses probiotics, mainly bifidobacteria and lactobacilli have been used with some success in prevention of allergic disease.

In order to be referred to as probiotic, bacterial strain has to undergo rigorous testing. We have selected three new *Lactobacillus* (*L.*) strains out of 24 human isolates according to their antagonistic activity against pathogenic bacteria, resistance to low pH and milieu of bile salts. Safety of these strains was proven upon intragastric administration to mice; moreover, we have shown their ability to shift cytokine Th1 - Th2 balance towards non-allergic Th1 response in isolated splenic cells.

Allergen specific prophylaxis using probiotics as vehicles for mucosal delivery of recombinant allergen is an attractive concept for development of well-tolerated and effective allergy vaccines. We have shown that neonatal mono-colonization of germ-free mice with the *L. plantarum* NCIMB8826 strain producing the major birch pollen allergen Bet v 1 attenuates the development of birch pollen allergy later in life. The mechanisms involve a shift towards a non-allergic Th1 phenotype accompanied by increased regulatory responses, which were antigen-specific as colonization by a wild type strain exerted no such effects.

Intrinsic immunomodulatory properties of the probiotic strain play a key role in its ability to interact with the immune system of the host. We have further shown that neonatal mother-to-offspring mono-colonization with *Bifidobacterium longum* CCDM367, a human isolate with Treg rather than Th1 immunomodulatory properties, was able to reduce allergic sensitization by activating regulatory responses via TLR2 and MyD88 signaling pathways.

Understanding what makes 'allergen an allergen' is a key in allergy prophylaxis or treatment. We have shown in a mouse model of food allergy that even minor irreversible changes in OVA secondary structure caused by thermal processing alter both its digestion and antigenic epitopes formation. This leads to activation of different T cell subpopulations, induces shift towards Th1 response and ultimately reduces its allergenicity.

Taken together, understanding the immunomodulatory potential of bacteria in the early host development can pave a new way for probiotic use in early nonspecific prevention of type I allergy. Combining the probiotics with relevant allergen can make this approach even allergen-specific.

## ABSTRAKT

Hlavním cílem v boji proti alergické epidemii je vývoj účinných preventivních strategií. Události v raném postnatálním období, jako je kolonizace bakteriemi, mají významný vliv na rozvoj vyvážených imunitních reakcí. Probiotika, zejména bifidobakterie a laktobacily, jsou vzhledem ke svému schopnostem modulovat imunitní odpověď hostitele nadějnými kandidáty pro prevenci alergických onemocnění.

Aby mohl být bakteriální kmen označen jako probiotický, musí projít přísným testováním. Z 24 lidských bakteriálních izolátů jsme vybrali tři nové kmeny rodu *Lactobacillus* (*L.*) podle jejich antagonistické aktivity vůči patogenním bakteriím, odolnosti proti nízkému pH a prostředí žlučových solí. V myším modelu jsme prokázali jejich bezpečnost a ukázali jsme jejich schopnost ovlivnit cytokinovou produkci směrem k protialergické Th1 odpovědi v izolovaných slezinných buňkách.

Využití probiotik jako vektorů pro slizniční podání rekombinantního alergenu je atraktivním přístupem ve vývoji dobře tolerovaných a účinných vakcín proti alergickým onemocněním. Ukázali jsme, že neonatální monokolonizace bezmikrobních myší rekombinantním kmenem *L. plantarum* NCIMB8826 produkujícím Bet v 1 snižuje senzibilizaci k březovému pylu v pozdějším životě. Mechanismus zahrnoval posun směrem k protialergickému Th1 fenotypu, doprovázenému zvýšenou regulační odpovědí. Tento účinek byl antigen specifický, protože kolonizace nerekombinantním kmenem žádné podobné účinky nevykazovala.

Přirozené imunomodulační vlastnosti probiotického kmene hrají klíčovou roli v jeho schopnosti interagovat s imunitním systémem hostitele. Když jsme pro neonatální monokolonizaci bezmikrobních myší použili lidský izolát s Treg spíše než Th1 imunomodulačními vlastnostmi *Bifidobacterium longum* CCDM367, pozorovali jsme celkové snížení alergické senzibilizace s aktivací regulačních odpovědí, pravděpodobně za využití TLR2 a MyD88 signálních drah.

Pochopení toho, co dělá alergen alergenem, je klíčem jak k profylaxi, tak i léčbě alergií. V myším modelu potravinové alergie jsme ukázali, že i nevelké nevratné změny v sekundární struktuře ovalbuminu, způsobené tepelným opracováním, mění způsob jeho štěpení a tvorbu antigenních epitopů, což vede k aktivaci odlišných T-buněčných subpopulací, indukuje posun směrem k Th1 odpovědi a redukuje jeho alergenicitu.

Lze tedy shrnout, že pochopení imunomodulačního potenciálu bakterií v časném stádiu vývoje hostitele nám umožní lepší využití probiotik v nespecifické prevenci alergie I. typu. Jako vektory k alergen-specifické profylaxi pak mohou sloužit probiotika produkující příslušný alergen.

## 1. ÚVOD

Počet alergických onemocnění v posledních desetiletích dramaticky narůstá, přičemž míra populační prevalence ve vyspělých zemích dosáhla téměř 30% (1). Předpokládá se, že absence mikrobiální stimulace v důsledku zvýšené hygieny má za následek snížení slizniční imunity doprovázené častější senzibilizací k alergenům, které jsou zdravou populací tolerovány (2, 3). Podle tzv. „hygienické hypotézy“ (4) se předpokládá, že za rozvoj alergií jsou odpovědné změny v mikrobiálním ekosystému střeva, které nedostatečně stimulují imunitní systém a v důsledku toho změny v Th1/Treg profilu cytokinů mohou způsobit posun k Th2 imunologické reakci odpovědné za vývoj alergií (5). Rostoucí zájem o vliv bakteriální střevní flóry na zdraví člověka podnítil různé strategie vedoucí k jejím možným úpravám. Z tohoto důvodu byly vybrány nepatogenní mikroorganismy, které by mohly být pro hostitele zdravotně přínosné. Tyto mikroorganismy byly označeny jako probiotika. Nejčastěji jsou využívány bakterie mléčného kvašení - bifidobakterie a laktobacily, které jsou testovány jako možné alternativy k úpravě střevní mikroflóry hostitele (6). Podle definice FAO/WHO jsou v současné době za probiotika považovány „živé mikroorganismy, které jsou-li podány v dostatečném množství, jsou zdravotním přínosem pro hostitele“ (7). Aby mohla být probiotika používána v humánní medicíně k léčbě a/ nebo prevenci alergií, musí být nové probiotické kmeny bakterií vybrány podle následujících kritérií. Musí být bezpečné k hostitelskému organismu, odolné vůči žaludečním kyselinám a žlučovým solím, aby přežily tranzit do střeva, a musí modulovat Th1-Th2 rovnováhu ve prospěch anti-alergické Th1 nebo Treg imunitní odpovědi (7, 8). Probiotická terapie je založena na konceptu normální zdravé mikroflóry. Bylo prokázáno, že určité bakteriální kmeny mají vysoce účinné antialergické a protizánětlivé vlastnosti (9, 10).

Probiotika ovlivňují vrozenou a adaptivní imunitní odpověď a potlačují kolonizaci střeva patogenními bakteriemi (11) tím, že přednostně obsazují omezený počet receptorů přítomných na povrchu epitelu (12). Mají vliv i na posílení bariérové funkce sliznice a zvýšené produkci sekrečního IgA (10). Studie na zvířatech a lidská studia poskytly jasné důkazy, že specifické kmeny probiotik jsou schopny stimulovat a také regulovat, některé aspekty přirozené i získané imunity.

Mezi potraviny, které nejčastěji vyvolávají alergické reakce, patří kravské mléko, slepičí vejce, arašídy, ořechy, ryby, koryši, pšenice a sója (13). V současnosti je velký zájem pochopit jak přesně tradiční metody upravování potravin ovlivňují jejich schopnost vyvolat alergickou senzibilizaci/reakci (14). Ačkoli je tradičně předpokládáno, že pečení, vaření, grilování, sušení, pasterizace a sterilizace alergenicitu potravin obecně snižují, v některých případech mohou tyto metody zvýšit alergizující potenciál alergenu tím, že odhalí epitopy, které byly maskovány v nativním proteinu

(14). Pochopení vztahu mezi strukturou alergenu a jeho schopností vyvolat alergickou senzibilizaci/reakci jsou klíčem k profylaxi nebo léčbě alergií.

## **2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE**

Obrovský nárůst výskytu alergií, který přerůstá až do rozměrů epidemie, představuje nebývalou zdravotní i finanční zátěž pro celý vyspělý svět. Nárůst počtu alergických onemocnění nelze vysvětlit pouze změnami v genomu, a proto bývá spojován se zvýšenou hygienou, která vede ke změnám mikrobiálních společenstev (mikrobiální dysbióze) v raném období života. V souladu se skutečností, že vývoj imunitního systému jedince je zahájen již v prenatální a časně postnatální ontogenezi, představuje toto období „okno příležitosti“ pro prevenci alergické senzibilizace. Z tohoto pohledu se časná intervence za použití probiotik jeví jako výhodný postup pro prevenci alergií. V disertační práci jsme si kladli za cíl vnést nový pohled do vzájemného vztahu mezi bakteriemi a imunitním systémem hostitele. Zaměřili jsme se na popis imunomodulačních vlastností probiotických bakterií a jejich možného využití v primární prevenci alergické senzibilizace v myším modelu alergie I. typu.

Specifické cíle disertační práce:

- Výběr nových probiotických bakteriálních kmenů a testování jejich imunomodulačních vlastností a bezpečnosti vůči hostiteli.
- Testování vhodnosti využití probiotik jako vektoru pro slizniční podání alergenu za účelem navození tolerance v gnotobiotickém myším modelu neonatální kolonizace.
- Prevence alergické senzibilizace probiotickými kmeny bakterií v gnotobiotickém myším modelu neonatální kolonizace a charakterizace jejich imunomodulačních účinků.
- Popsat vliv změny sekundární struktury alergenu na jeho alergenicitu v myším modelu potravinové alergie.



### 3. MATERIÁL A METODIKA

#### 3.1 Bakteriální kmeny, testování a příprava

Kmeny rodu *Lactobacillus* byly izolovány ze stolice zdravých novorozenců a byly získány ze sbírky Pure Culture Collection of Technical University, Lodz (LOCK). *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM367 (*B. longum*) bylo získáno ze sbírky Culture Collection of Dairy Microorganisms (Milcom, Česká republika) a *Lactobacillus (L.) plantarum* NCIMB8826 byl získán ze sbírky National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria (Aberdeen, Scotland). Kmeny *Lactobacillus* byly kultivovány v MRS médiu (Oxoid, UK) po dobu 24 hodin při 37°C, *B. longum* bylo kultivováno anaerobně v médiu MRS obohaceném o L-cystein-hydrochlorid (0,5 g/l) po dobu 48 hodin při 37°C. Pro stanovení odolnosti vůči nízkému pH byly kmeny *Lactobacillus* inkubovány v 0,85% NaCl při pH 1,5, 2,5 a 3,5 po dobu 2 hodin. Účinek žluči byl sledován použitím 2 a 4% roztoku žlučových solí (Ox gall powder; Sigma, Germany) po dobu 48 hodin. Antagonistické účinky k patogenům byly testovány na agarových kolečkách o průměru 10 mm. Ty byly asepticky vyříznuty z MRS agaru, nechaly se porůst příslušným testovaným kmenem, a pak byly umístěny na misky s agarovým médiem (Nutrient agar; Merck, Germany) a inokulovány indikátorovým kmenem ( $10^5$ – $10^6$  CFU/ml). Po 18 hodinové inkubaci byly měřeny průměry inhibičních zón kolem agarového kolečka. Pro účely *in vitro* experimentů byly bakterie inaktivovány tepelně (30 min, 80°C) nebo 1% formaldehydem v PBS (4 hodiny, laboratorní teplota).

#### 3.2 Konstrukce rekombinantního kmene *Lactobacillus plantarum*

*L. plantarum* NCIMB8826 byl využit jako nositel plazmidu pro konstitutivní intracelulární produkci Bet v 1. *Escherichia (E.) coli* MC1061 byla použita jako mezihostitel pro klonování a byla kultivována při 37°C v Luriově bujónu. Antibiotika byla užita v následujících koncentracích: pro *E. coli* ampicillin (100 µg/ml), pro *L. plantarum* erythromycin (5 µg/ml). Molekulárně biologické techniky jako elektrotransformace a klonovací techniky již byly popsány (15). Výsledný plazmidový konstrukt (pMEC181) nesl sekvenci Bet v 1 kódovanou pod kontrolou laktát dehydrogenázového promotoru. Nakonec byl *L. plantarum* elektrotransformován s pMEC181; tak vznikl erytromycin-rezistentní *L. plantarum* (recLp) konstitutivně produkující Bet v 1. Do kontrolního kmene (conLp) *L. plantarum* NCIMB8826 byl elektroporován prázdný plazmid pGIT032.

#### 3.3 Analýza produkce Bet v 1

Analýza produkce Bet v 1 byla popsána (15).

#### 3.4 Příprava ovalbuminu (OVA), cirkulární dichroismus (CD) a enzymatické štěpení

K imunizaci byl použit nativní OVA (Worthington, USA) a OVA tepelně opracovaný (heated) OVA (h-OVA, který byl připraven vystavením teplotě 70°C po dobu 10 minut). Poté byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru (PBS) na konečnou koncentraci 300 mg/ml s 5 mg/ml hydroxidu hlinitého jako adjuvans (Alum, Sigma, Germany). Pro *in vitro* studie byl používán také vařený (boiled) OVA (b-OVA), získaný vystavením nativního OVA teplotě 95°C po dobu 10 minut.

Pro monitorování spekter CD byly vzorky rozpuštěny v 5 mM fosfátovém pufru (pH 7,4) a změřeny ASCO J-815 spektropolarimetrem s PTC-423S Peltier držákem (Jasco, Japan). Tepelná denaturace proteinů byla monitorována od 20°C do 70°C nebo od 20°C do 95°C při fixní vlnové délce 222 nm s teplotním krokem 1°C/min. Peptidy z OVA, h-OVA nebo b-OVA byly připraveny užitím pepsin-agarozového gelu, jak již bylo popsáno (16). Enzymaticky natrávené a nenatrávené proteiny byly separovány na SP 250/10 NUCLEOSIL 300-7 C18 koloně (Macherey-Nagel, Germany) pomocí HPLC system Gold 125NM Solvent Module (Beckman Coulter, USA). Vzorky byly aplikovány a separovány na koloně, jak již bylo dříve popsáno (16).

### 3.5 Příprava a aktivace dendritických buněk odvozených z buněk kostní dřene

Dendritické buňky odvozené z kostní dřene (bone marrow-derived dendritic cells, BM-DC) byly připraveny z myši kmene BALB/c a z wild-type, TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> a MyD88<sup>-/-</sup> myši na C57BL/6 pozadí, jak již bylo popsáno (17). BM-DC (10<sup>6</sup> buněk/jamku) byly stimulovány s formalinem-inaktivovanou bakterií *B. longum* (10<sup>6</sup> nebo 10<sup>7</sup> CFU) po dobu 18 hodin. Jako kontroly byly použity BM-DC inkubované s Pam3CSK4 (1 µg/ml, InvivoGen, USA) nebo ultračistým LPS (1 µg/ml, InvivoGen, USA). Hladiny IL-10, TGF-β a IL-6 byly stanoveny v supernatantu po kultivaci metodou ELISA Ready-Set-Go! kits (eBioscience, USA) podle instrukcí výrobce. Hladiny IL-12p70 byly měřeny metodou ELISA pomocí párových protilátek (BD Pharmingen, USA). V některých experimentech byly BM-DC předkultivovány se specifickými inhibitory kináz MEK, p38, JNK nebo NF-κB po dobu 1 hodiny při 37°C.

### 3.6 Stimulace HEK293 buněk stabilně transfekovanými Toll-like receptory (TLR)

HEK293 buňky stabilně transfekovanými plazmidy nesoucími lidské (h, human) TLR2 a hTLR4/MD2/CD14 byly stimulovány s formalinem-inaktivovanou bakterií *B. longum* (10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> CFU/ml). TLR2 ligand Pam3C (1 µg/ml) a TLR4 ligand LPS (1 µg/ml) byly použity jako pozitivní kontroly. Po 20 hodinové kultivaci byla v supernatantu stanovena hladina IL-8 metodou ELISA (Thermo Scientific, USA) podle instrukcí výrobce.

### 3.7 Zvířata

Bezmikrobní (germ-free, GF) myši kmene BALB/c byly chovány za sterilních podmínek s cyklem 12 hodin světlo–tma při 22°C. Myši byly krmeny sterilními peletami (ST1, Bergman, Česká republika) a vodou *ad libitum*. Vzorky stolice byly kontrolovány jednou za týden, aby byla vyloučena bakteriální kontaminace (18). Konvenční myši kmene BALB/c a myši geneticky neupravené (wild-type), TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, MyD88<sup>-/-</sup> na pozadí kmene C57BL/6 byly chovány za standardních podmínek.

### 3.8 Stabilita a testování bakteriálních kmenů v podmínkách *in vivo*

Bezmikrobní BALB/c myši byly kolonizovány dávkou 2 x 10<sup>8</sup> CFU recLp, conLp nebo *B. longum* intragastrickou sondou. Jejich pitná voda byla obohacena o erytromycin (50 µg/ml) pro zajištění lepší stability vektoru v rekombinantních bakteriích *in vivo*. Stabilita kolonizace bakteriemi a přítomnost plasmidu

pMEC181 byla týdně analyzována výsevem na MRS agar s/ bez 5 µg/ml erythromycinu. V případě bakterií *B. longum* byla kultivace anaerobní na MRS s cysteinem.

Konvenční BALB/c myši dostávali dvakrát denně dávku  $5 \times 10^8$  CFU směsi tří laktobacilů pomocí měkké gumové sondy po dobu jednoho týdne. Imunitní odpověď indukovaná recLp přirozenou kolonizací od matek byla testována u samic kmene BALB/c ve stáří 8 týdnů.

### 3.9 Schéma alergické senzibilizace

Myši, které byly neonatálně monokolonizovány recLp, conLp, *B. longum* nebo nekolonizované GF, byly senzibilizovány intraperitoneálně (i.p.) nebo subkutánně ve stáří 56 dnů třikrát v desetidenních nebo čtrnáctidenních intervalech dávkou 1 µg Bet v 1 (Biomay AG, Vienna) adsorbovanou ve 200 µl fyziologického roztoku obsahujícího 2 mg hydroxidu hlinitého (Serva, Germany). Myši byly zabity 7 dní po poslední imunizaci. Stejně staré neovlivněné GF myši sloužily jako kontroly, pokud to bylo potřeba. Konvenční BALB/c myši byly senzibilizovány i.p. ve dvou čtrnáctidenních intervalech dávkou 60 µg OVA nebo h-OVA dohromady s 1 mg hydroxidu hlinitého v konečném objemu 200 µl. Kontroly dostaly pouze 200 µl fyziologického roztoku s 1 mg hydroxidu hlinitého. Dva týdny po poslední imunizaci byly myši sondovány intragastrickou gaváží 15 mg OVA ve 150 µl PBS desetkrát v 2-3 denních intervalech.

### 3.10 Buněčné kultury a stanovení cytokinů

Mezenterální mízní uzliny (MLN) a sleziny byly vyjmuty na konci experimentu. Jednobuněčná suspenze byla připravena v médiu RPMI-1640, obsahujícím 10% fetální hovězí sérum (BioClot GmbH, Německo) a 1% antibiotický-antimykotický roztok (Sigma-Aldrich). Buňky ( $6 \times 10^5$ /jamku) byly kultivovány v 96-jamkových deskách s plochým dnem (TPP, Trasadingen, Švýcarsko) bez přidaného antigenu nebo v přítomnosti buď OVA či h-OVA (100 µg/jamku) po dobu 72 hodin (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) nebo Bet v 1 (20 µg/ml) po dobu 60 hodin. Alternativně,  $5 \times 10^6$  buněk/500 µl bylo kultivováno s Bet v 1 v 48-jamkových destičkách (Corning, NY, USA) po dobu 48 hodin nebo byly slezinné buňky ( $5 \times 10^5$ /jamku) kultivovány v 96-jamkových destičkách se směsí tepelně inaktivovaných kmenů *Lactobacillus* ( $10^5$  CFU/jamku) po dobu 72 hodin. Supernatanty byly shromážděny a uloženy při teplotě -40°C až do analýzy. Interleukiny (IL)-4, IL-6, IL-13, IL-17, IL-5, IL-10, TNF-α a interferon (IFN)-γ byly v supernatantech měřeny za použití ELISA kitů (RnD, USA) nebo za použití MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokine (magnetického) panelu (Millipore, USA) a analyzovány pomocí Bio-Plex systému (Bio-Rad Laboratories, USA).

Schopnost OVA, h-OVA a b-OVA a jejich enzymatických štěpů (100 mg/jamku) indukovat T regulační buňky byla vyhodnocena po jejich 48-hodinové kultivaci s naivními myšimi splenocyty. Proliferační odpověď slezinných kultur s/ bez přidaného Bet v 1 byla stanovena měřením inkorporovaného <sup>3</sup>H-thymidinu (0,5 µCi/jamku, Lacomed, Česká republika) do DNA buněk za posledních 16 hodin z celkové 76-hodinové kultivace.

### 3.11 Měření protilátkové imunitní odpovědi

Hladiny alergen-specifických IgE, IgG1, IgG2a a IgA protilátek v séru byly stanoveny metodou ELISA, jak již bylo popsáno (19). Stručně, 96-jamková mikrotitrační desky (Nunc, Dánsko) byly pokryty odpovídajícím

alergenem a příslušně naředěná séra byla použita pro stanovení protilátek. Potkaní anti-myší IgE, IgG1, IgG2a a IgA protilátky (Pharmingen, USA) a s peroxidázou konjugované myší anti-potkaní IgG (Jackson, Immuno Labs., USA) protilátky byly použity pro jejich detekci. Alternativně, alergen specifické IgE v séru bylo stanoveno degranulací buněk potkaních bazofilů (RBL-2H3). RBL-2H3 buňky byly kultivovány v 96-jamkové destičce ( $4 \times 10^4$  buněk/jamku) a pasivně senzibilizované inkubací s myším sérem naředěným 1/90 po dobu 2 hodin. Po promytí, OVA, h-OVA nebo b-OVA (0,6  $\mu\text{g/ml}$ ) nebo Bet v 1 (0,3  $\mu\text{g/ml}$ ) byly přidány na 30 minut k vyvolání degranulace bazofilů. Supernatanty byly inkubovány s 4-metylbumbelliferyl-N-acetyl-BD-glukosaminem (Sigma-Aldrich, USA) a uvolněná  $\beta$ -hexosaminidáza byla stanovena fluorescenčně ( $\lambda\text{ex}$ : 360 nm/ $\lambda\text{em}$ : 465 nm) přístrojem Infinite M200. Hladiny celkového IgE a IgA v séru a ve střevních výplacích (výplachy byly připraveny jak bylo dříve popsáno (15)) byly měřeny metodou ELISA (Bethyl, USA), hladiny IL-10 a TGF- $\beta$  byly měřeny použitím ELISA sady Ready-Set-go! (eBioscience, USA) podle instrukcí výrobce.

### 3.12 Kvantitativní PCR

RNA byla izolována ze sleziny recLp kolonizovaných a GF myší senzibilizovaných Bet v 1 pomocí RNeasy Minikit (Quiagen, USA). Po ošetření DNazou byla integrita RNA a její čistota určena gelovou elektroforézou a spektrofotometrickým stanovením (260/280 nm). Reverzní transkripce do cDNA byla provedena pomocí oligo (dT) 15 primerů (ImProm-IITM Reverse TranscriptionSystem, Promega, USA). Sondy z Knihovny univerzálních sond (UPL) (Roche, Německo) byly použity pro kvantifikaci TGF- $\beta$ 1 (UPL # 15), IL-10 (UPL # 13), Foxp3 (UPL # 13) a  $\beta$ -aktinu (UPL # 101). Expres genů byla stanovena pomocí FastStart TaqMan Master Mixu (Roche) na real-time PCR cyklieru (Bio-Rad, USA). Reakční podmínky byly následující: 95°C po dobu 10 min, následovalo 45 cyklů 15 s při teplotě 95°C a 30 s při teplotě 60°C. Relativní kvantifikace byla provedena za použití GENEX softwaru (MultiD Analýzy AB, Švédsko).

### 3.13 Průtoková cytometrie

Buněčné suspenze ze slezin a MLN byly označeny pro detekci regulačních T buněk pomocí FoxP3 Staining Buffer Set (eBioscience, USA) s využitím fluorochrom-konjugovaných monoklonálních protilátek pro CD4 (fluorescein-5-isothiokyanát), CD25 (alofykocyanin) a Foxp3 (fykoerytrin) (eBioscience, USA). Dendritické buňky byly označeny monoklonálními protilátkami pro CD11c (fluorescein-5-isothiokyanát), MHCII (alofykocyanin), CD40, CD80 nebo CD86 (fykoerytrin) (eBioscience, USA). Buňky byly analyzovány průtokovým cytometrem FACSCalibur (Becton-Dickinson, USA) a analyzovány FlowJo 7.6.2 softwarem (TreeStar, USA).

### 3.14 Stanovení aktivity enzymů v kartáčovém lemu enterocytů

Jejunum bylo vyjmuto, promyto studeným fyziologickým roztokem a membrány kartáčového lemu (BBMV) byly připraveny ze stěrů, jak je popsáno v práci Kessler a spol. (20). Obsah proteinu v BBMV byl stanoven metodou Lowry a spol. (21), hovězí sérový albumin (frakce V, Serva, Německo) sloužil jako standard.

Aktivita alkalické fosfatázy (ES 3.1.3.1),  $\gamma$ -glutamyltranspeptidázy (ES 2.3.2.2), dipeptidyl peptidázy IV (ES 3.4.14.5), laktázy (ES 3.2.1.23/62/108) a sacharázy (ES 3.2.1.48/10) byla stanovena jak bylo popsáno (22).

### 3.15 Statistická analýza

Rozdíly mezi více experimentálními skupinami byly zhodnoceny jednosměrnou analýzou rozptylu (ANOVA) s Tukey-ho srovnávacím testem. Rozdíly mezi dvěma skupinami byly hodnoceny pomocí nepárového dvouvýběrového Studentova t-testu nebo pomocí neparametrického Mann-Whitney-ho testu. K vyhodnocování byl použit statistický software GraphPad Prism (verze 5.03 GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## 4. VÝSLEDKY

### Probiotic *Lactobacillus* strains: *in vitro* and *in vivo* studies.

Cukrowska B, Motyl I, Kozakova H, **Schwarzer M**, Gorecki RK, Klewicka E, Slizewska K, Libudzisz Z. *Folia Microbiol* (Praha) 2009;54:533-537.

V této práci jsme se zaměřili na výběr nových probiotických kmenů lidského původu a charakterizaci jejich bezpečnosti a imunomodulačního profilu ve zvířecím modelu.

- **Z 24 bakteriálních izolátů rodu *Lactobacillus*, izolovaných ze zdravých kojených dětí, jsme vybrali 3 kmeny LOCK 0900, LOCK 0908, LOCK 0919 na základě jejich antagonistické aktivity proti patogenním bakteriím, odolnosti proti nízkému pH a prostředí žlučových solí.**
- **Ukázali jsme jejich bezpečnost v myším modelu. Bakterie netranslokovaly přes střevní bariéru do krve, jater a sleziny.**
- **Slezinné buňky, izolované z myší krmených laktobacily, vykazovaly změny v Th1-Th2 cytokinové rovnováze směrem k proti-alergické Th1 reakci po opětovné *in vitro* restimulaci testovanými kmeny.**

Naše studie ukázala, že izoláty rodu *Lactobacillus* se značně liší ve schopnosti odolávat drsnému prostředí trávicího traktu. Nové probiotické kmeny je zapotřebí důkladně testovat.

---

**Neonatal colonization of mice with *Lactobacillus plantarum* producing the aeroallergen Bet v 1 biases towards Th1 and T-regulatory responses upon systemic sensitization.**

Schwarzer M, Repa A, Daniel C, Schabussova I, Hrcir T, Pot B, Stepankova R, Hudcovic T, Pollak A, Tlaskalova-Hogenova H, Wiedermann U, Kozakova H. *Allergy* 2011;66:368-375.

V gnotobiologickém myším modelu neonatální kolonizace jsme se zaměřili na testování vhodnosti využití rekombinantního *L. plantarum*, konstitutivně produkujícího hlavní březový pylový alergen Bet v 1, jako slizničního vektoru pro dodání antigenu v prevenci alergií.

- **Vytvořili jsme *L. plantarum* konstitutivně produkující hlavní alergen pylu břízy Bet v 1.**
- **Ukázali jsme stabilitu kmene *in vivo* a jeho schopnost posunout buněčnou imunitní odpověď na k Th1 profilu u neonatálně kolonizovaných myší.**
- **Při systémové senzibilizaci jsme pozorovali snížení alergické reakce u myší osídlených rekombinantním kmenem.**
- **Mechanismus zahrnoval posun směrem k proti-alergickému Th1 fenotypu doprovázenému zvýšenou regulační odpovědí.**

Mono-kolonizace bezmikrobních myší rekombinantním *L. plantarum* vyvolalo specifickou imunomodulaci alergické imunitní odpovědi. Naše výsledky podporují využití rekombinantních bakterií mléčného kvašení pro časnou alergen-specifickou prevenci alergie I. typu.

---

**Neonatal colonization of germ-free mice with *Bifidobacterium longum* prevents allergic sensitization to Bet v 1.**

Schwarzer M, Srutkova D, Schabussova I, Hudcovic T, Akgün J, Wiederman U, Kozakova H. Manuscript in preparation.

Probiotické kmeny se schopností vyvolat spíše regulační než Th1 odpověď by mohly být úspěšnější v potlačení alergických reakcí. Testovali jsme neonatální kolonizaci lidským izolátem *B. longum* v našem gnotobiotickém myším modelu alergie I. typu.

- **Ukázali jsme, že kolonizace myší bakterií *B. longum* snižuje alergickou senzibilizaci jak na buněčné, tak na humorální úrovni.**
- **Mechanismus zahrnoval indukci regulační imunitní odpovědi.**

- ***In vitro*, *B. longum* indukoval zvýšenou produkci regulačních cytokinů IL-10 a TGF- $\beta$  z dendritických buněk odvozených z kostní dřevě.**
- **Tato indukce byla závislá na signalizaci přes TLR2 a MyD88.**

Naše výsledky ukazují, že neonatální mono-kolonizace bakterií *B. longum* snižuje alergickou senzibilizaci aktivací regulačních reakcí za využití TLR2 a MyD88 signálních drah. To dělá z *B. longum* slibného kandidáta pro perinatální intervenční strategii proti vzniku alergických onemocnění člověka.

---

### **Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy.**

Golias J, Schwarzer M, Wallner M, Kverka M, Kozakova H, Srutkova D, Klimesova K, Sotkovsky P, Palova-Jelinkova L, Ferreira F, Tuckova L. *PLoS ONE* 2012;7(5): e37156.  
doi:10.1371/journal.pone.0037156.

Tepelné zpracování ovlivňuje alergenicitu antigenů. Testovali jsme schopnost tepelně zpracovaného vaječného albuminu (OVA) vyvolat alergické příznaky a imunitní odpověď v myším modelu potravinové alergie.

- **Zahřátí OVA na 70°C způsobilo jen mírné nevratné změny v sekundární struktuře ve srovnání s vařením.**
- **Nicméně, oba způsoby tepelného opracování vedly k značně odlišné kinetice štěpení a schopnosti indukovat T regulační buňky *in vitro* ve srovnání s nativním OVA.**
- **Zahřátí OVA na 70°C výrazně snížilo klinické příznaky, imunitní alergickou reakci a změnilo činnost střevních hydroláz.**
- **Naproti tomu OVA zahřátý na 70°C stimuloval vyšší hladinu IgG2a v séru a vyšší sekreci IFN- $\gamma$  ve splenocytech.**

Drobné nevratné změny v sekundární struktuře OVA způsobené tepelným zpracováním mění jak jeho enzymatické štěpení, tak tvorbu antigenních epitopů. To vede k aktivaci různých T buněčných subpopulací, indukuje posun směrem k Th1 imunitní odpovědi a snižuje jeho alergenicitu.

---

## 5. DISKUZE

### 5.1 Výběr probiotických bakterií

V současnosti probíhá intenzivní výzkum využití bakterií k úpravě novorozenecké bakteriální dysbiózy, která je pravděpodobně jednou z hlavních příčin nárůstu výskytu alergických onemocnění. Podle definice WHO (7) by tyto bakterie měly být živé, i když existují studie ukazující, že i mrtvé bakterie nebo bakteriální lyzáty mají schopnost modulovat imunitní systém hostitele (23). Pokud mají bakterie přežít průchod trávicím traktem až do střeva, musí být potenciální probiotika odolná vůči působení žaludečních kyselin a žlučových solí. Dále, pokud mají být použity v humánní medicíně, musí být bezpečné pro hostitelský organismus (7). Ukázali jsme, že z 24 laktobacilových kmenů, izolovaných ze zdravých kojených dětí, jich jen pět vykazovalo odolnost vůči působení žaludečních a žlučových kyselin *in vitro*. Kromě přežití krutého prostředí zažívacího traktu je požadováno, aby probiotické bakterie dobře přilnuly ke střevním epiteliálním buňkám, protože jen tak mohou zůstat ve střevě déle a mohou zabránit vazbě patogenů, a tím interagovat s epiteliálními a imunitními buňkami hostitele (24). Na tomto základě byly nakonec vybrány jen tři kmeny, které prokázaly schopnost přilnout k epitelové buněčné linii Caco-2. Kromě jejich schopnosti odolat prostředí trávicího traktu jsme ukázali, že všechny tři vybrané kmeny mají antagonistický účinek proti vybraným patogenním bakteriálním kmenům, což naznačuje, že by mohly hrát důležitou pozitivní roli v modulaci střevní mikroflóry. Abychom otestovali bezpečnost vybraných kmenů, byla jejich směs sondována myším do žaludku po dobu sedmi dní. Na konci experimentu jsme nezjistili žádné translokace přes střevní bariéru do krve a vnitřních orgánů, bakterie translokovaly pouze do MLN. Translokace bakterií do MLN byla u myší popsána (25). Vzhledem k tomu, že MLN jsou nyní brány jako křižovatka mezi periferní a slizniční imunitou, translokace bakterií může být nezbytná pro uplatnění jejich imunomodulační funkce na úrovni systémové imunity (26). A opravdu, když jsme slezinné lymfocyty z myší, kterým byly podány laktobacily, kultivovali s těmito bakteriemi, pozorovali jsme vyšší produkci proti-alergických Th1 cytokinů a nižší produkci pro-alergického IL-5, než tomu bylo u buněk získaných z kontrolních myší.

Ukázali jsme, že vybrané bakteriální kmeny jsou schopny odolávat střevním podmínkám a interagovat s imunitním systémem hostitele. *In vivo* myší experimenty prokázaly bezpečnost kmenů; vybrané kmeny byly navíc schopné posunout cytokinovou rovnováhu ve prospěch anti-alergické imunitní reakce, což z nich činí slibné kandidáty pro prevenci/ terapie alergických onemocnění.



## 5.2 Perinatální intervence probiotiky v prevenci alergické senzibilizace

Použití probiotických bakterií s přirozenou schopností indukovat Th1 nebo T regulační imunitní odpověď pro slizniční dodání rekombinantního alergenu je atraktivní koncept pro rozvoj dobře tolerovaných a účinných proti-alergických vakcín (27). Předpokládá se, že bakteriální intervence časně po narození, v tzv. „okně příležitosti“, kdy je zahájeno programování imunitního systému, patří k nejúspěšnějším (28). Bakterie *L. plantarum* NCIMB8826 je dobře charakterizovaný kmen se silnými Th1 imunomodulačními vlastnostmi. Vytvořili jsme rekombinantní kmen, konstitutivně produkující hlavní březový pylový alergen Bet v 1. Abychom dosáhli co nejčasnější intervence, zavedli jsme model neonatální kolonizace. Bezmikrobní myši byly kolonizovány a jejich potomci se rekombinantním kmenem osadili přímo od matek. Poté, co jsme potvrdili, že kolonizace rekombinantní bakterií a produkce Bet v 1 je stabilní, jsme zjistili, že rekombinantní kmen je schopen vyvolat proti-alergickou Th1 odpověď s produkcí IFN- $\gamma$  ve slezinných buňkách při opětovné expozici alergenu *in vitro*. Tyto nálezy nám potvrdili důležitost výběru kmene, stejně jako načasování kolonizace, protože předchozí práce s bakterií *Lactobacillus casei* produkující beta-laktoglobulin ukázala, že kolonizace dospělých bezmikrobních myší vedla k produkci jak Th1, tak Th2 cytokinů (29). Když byl jako vektor použita Gram negativní bakterie *E. coli* produkující ovalbumin, Dahlman a spol. detekoval indukcí alergen-specifických IgE, což ukazuje na zhoršení a alergických příznaků (30). Když byly naše neonatálně kolonizované myši následně senzibilizované pylovým březovým alergenem Bet v 1, našli jsme u nich posun směrem k nealergickému Th1 fenotypu na buněčné úrovni doprovázenému zvýšenou regulační odpovědí, zřejmě již ze snížených hladin obou Bet v 1 specifických IgG1 a IgG2a v séru a zvýšené produkce mRNA pro Foxp3 marker regulačních lymfocytů ve slezině. Pozorované účinky byly antigen-specifické; kolonizace myší divokým typem *L. plantarum* neměla žádné podobné účinky.

V současné době se zdá, že probiotické kmeny se schopností vyvolat regulační reakce, spíše než kmeny indukující Th1 fenotyp, jsou v prevenci alergických reakcí úspěšnější (17, 31). Vzhledem k tomu, že *L. plantarum* je kmen se silnými Th1 imunomodulačními vlastnostmi (32) a že původní divoký typ *L. plantarum* v naší předchozí práci neprojevil žádné tlumivé účinky na vývoj alergické imunitní odpovědi (33), rozhodli jsme se otestovat probiotický kmen, který na základě našeho *in vitro* testování vykazoval spíše Treg imunomodulační kapacitu. Vybrali jsme kmen *Bifidobacterium longum* spp. *longum* CCDM367 (*B. longum*), izolovaný ze zdravých kojenců. U něj bylo prokázáno, že indukuje regulační cytokin IL-10 *in vitro* a že má schopnost potlačit zánětlivé reakce v myším modelu experimentální kolitidy (Šrůtková, nepublikované výsledky). Po alergické senzibilizaci se u myší, které byly neonatálně monokolonizovaných kmenem *B. longum* významně snížil vývoj alergen-specifických imunitních reakcí. Toto snížení bylo spojené s indukcí

regulačního prostředí, a to jak na humorální, tak i na buněčné úrovni. U kolonizovaných myší jsme v séru detekovali zvýšené hladiny regulačních cytokinů IL-10 a TGF- $\beta$ . Naše výsledky jsou podporovány nedávným zjištěním, že některé kmeny bakterií mohou nasměrovat DC k indukci Foxp3 pozitivních regulačních T-buněk a zvýšené produkci IL-10 (34). Indukce Treg buněk produkujících IL-10 bylo rovněž prokázáno u myší po podání bifidobakterií (35). S cílem lépe charakterizovat imunomodulační vlastnosti vybrané bakterie jsme *in vitro* prokázali, že *B. longum* indukuje v BM-DC zvýšenou produkci IL-10 a TGF- $\beta$  cytokinů a pouze nízkou hladinu cytokinu IL-12. Je dobře zdokumentováno, že probiotické bakterie jsou na různých buňkách rozpoznány přes PRR (8, 32). Pomocí BM-DC z knock-out myší jsme ukázali, že produkce IL-10 indukovaná bakterií *B. longum* je závislá na TLR2 a MyD88 a nezávislé na TLR4; další signalizace pak zahrnovala MEK, JNK, P38 a NF $\kappa$ B.

### 5.3 Změna v alergenicitě antigenu po tepelné úpravě

V současnosti je velký zájem pochopit jak přesně tradiční metody upravování potravin ovlivňují jejich schopnost vyvolat alergickou senzibilizaci/ reakci (14). Ačkoli bylo zdokumentováno, že pečení, vaření, grilování, sušení, pasterizace a sterilizace vedou ke snížení alergenicity, v některých případech mohou tyto metody zvýšit alergizující potenciál, nebo mohou odhalit tzv. neo-epitopy, které byly maskované v nativním proteinu (14). Tím, že tvoří přibližně 60% z celkových proteinů vaječného bílku, je z nich OVA zdaleka nejhojnější. Alergie na vejce patří mezi nejčastější potravinové alergie a jejich prevalence a závažnost se v posledních desetiletích neustále zvyšuje (36).

Ukázali jsme, že zahřívání vaječného alergenu na 70°C (h-OVA) má jen minimální vliv na jeho sekundární strukturu ve srovnání s OVA zahřátým na 95°C. Nicméně, i tyto malé změny měly velký vliv na imunologické chování alergenu. Protein h-OVA byl odolnější vůči proteolytickému trávení a po 20 minutách se choval podobně, jako OVA zahřátý na teplotu 95 °C. Navíc měly podobnou schopnost indukovat FoxP3<sup>+</sup> buňky *in vitro*. Ve shodě s našimi výsledky byly nedávno popsány tlumivé účinky některých OVA T-buněčných peptidových epitopů na alergické imunitní reakce prostřednictvím indukce FoxP3<sup>+</sup> T buněk (37).

V souladu s těmito *in vitro* údaji se ukázalo, že schopnost vyvolat alergickou imunitní reakci je u h-OVA snížena. Zahřátím OVA se významně snížily klinické příznaky (alergický průjem) a imunitní alergické reakce, jak bylo patrné z produkce IgE, IL-4, IL-5, IL-13. Dále, h-OVA vyvolal v séru nižší aktivitu MCPT-1 a nižší aktivitu alkalické fosfatázy v membráně kartáčového lemu enterocytů ve srovnání s nativním OVA. Na druhé straně, h-OVA stimuloval v séru vyšší IgG2a a vyšší sekreci IFN- $\gamma$  ze splenocytů. Význam strukturálních epitopů v tvorbě specifických protilátek se

projevil, když jsme změnili antigen (h-OVA byl použit pro stanovení protilátek ze séra myší senzibilizovaných OVA a naopak) pro jejich stanovení. Navíc, signál byl signifikantně vyšší, když byl h-OVA antigen použit pro stanovení specifických IgG1 protilátek. Předpokládáme, že je to způsobeno tím, že ohřev alergenu odkrývá lineární epitopy a tím doplňuje ztrátu těch konformačních. Na druhou stranu, když jsme pro stanovení protilátek použili OVA zahřátý na teplotu 95 °C, zaznamenali jsme silný pokles signálu u všech OVA-specifických protilátek.

Prokázali jsme, že i mírné změny v sekundární struktuře OVA po tepelném zpracování mají dalekosáhlé důsledky týkající se jeho antigenních vlastností. Po proteolytickém štěpení vytváří h-OVA fragmenty s odlišnými imunogenními vlastnostmi, které vedou k posunu od Th2 k Th1 typu reakce ve srovnání s nativním OVA. Nicméně, h-OVA fragmenty mají stále schopnost vyvolávat alergické příznaky, ale ty jsou méně výrazné a potřebují delší čas na rozvinutí.

## 6. ZÁVĚRY

(A) Ukázali jsme, že bakterie *Lactobacillus* LOCK 0900, LOCK 0908 a LOCK 0919 jsou schopné odolat antimikrobiálnímu prostředí střeva a interagovat s imunitním systémem hostitele. V *in vivo* myších experimentech posunuly produkci cytokinů ve prospěch anti-alergické imunitní reakce. Směs těchto tří kmenů tak představuje probiotický bakteriální přípravek s možností využití v profylaxi a / nebo léčbě alergických onemocnění.

(B) Neonatální mono-kolonizace původně bezmikrobních myší kmenem *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826, produkujícím hlavní březový pylový alergen Bet v 1, zeslabuje rozvoj pylové alergie později v životě. Jako mechanismus se zde uplatňoval posun směrem k proti-alergickému Th1 fenotypu doprovázený zvýšenou regulační odpovědí. Z našich dat vyplývá, že intervence při narození s živou rekombinantní bakterií *L. plantarum* produkující klinicky relevantní alergen, snižuje experimentální alergii a může se proto stát účinnou strategií pro včasnou prevenci proti nástupu alergických onemocnění.

(C) Dále jsme ukázali, že neonatální mono-kolonizace původně bezmikrobních myší kmenem *Bifidobacterium longum* vyvolala indukci regulačních cytokinů/ T buněk přes TLR2 a MyD88 signální dráhy a tím zabránila alergické senzibilizaci. Proto může být *B. longum* považován za slibného kandidáta pro perinatální intervenční strategie s cílem zabránit vzniku alergických onemocnění u lidí. Navíc, naše výsledky zdůrazňují obecný význam imunomodulačních vlastností bakteriálního kmene použitého pro intervenci a osvětlují možnou funkci bifidobakterií při formování imunitního systému na počátku lidské ontogeneze.

(D) V myším modelu potravní alergie jsme se zaměřili na objasnění významu sekundární struktury antigenu pro jeho alergenicitu. Zjistili jsme, že zahřátí ovalbuminu na 70°C má jen malý vliv na jeho sekundární strukturu. Nicméně, tyto drobné nevratné změny v sekundární struktuře změnily jak jeho štěpení, tak i tvorbu antigenních epitopů. Tím vedly k aktivaci různých T buněčných subpopulací, vyvolaly posun směrem k Th1 odpovědi a snížily jeho alergenicitu.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- 1 Wills-Karp, M., Nathan, A., Page, K., and Karp, C.L. (2010) New insights into innate immune mechanisms underlying allergenicity. *Mucosal Immunol* 3, 104-110
- 2 Tlaskalova-Hogenova, H., Tuckova, L., Mestecky, J., Kolinska, J., Rossmann, P., Stepankova, R., Kozakova, H., Hudcovic, T., Hrcir, T., Frolova, L., and Kverka, M. (2005) Interaction of mucosal microbiota with the innate immune system. *Scand J Immunol* 62 Suppl 1, 106-113
- 3 Tlaskalova-Hogenova, H., Stepankova, R., Hudcovic, T., Tuckova, L., Cukrowska, B., Lodinova-Zadnikova, R., Kozakova, H., Rossmann, P., Bartova, J., Sokol, D., Funda, D.P., Borovska, D., Rehakova, Z., Sinkora, J., Hofman, J., Drastich, P., and Kokesova, A. (2004) Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett* 93, 97-108
- 4 Ponsonby, A.L. and Kemp, A. (2008) Investigation of the hygiene hypothesis: current issues and future directions. *Allergy* 63, 506-508
- 5 Bjorksten, B. (1999) Allergy priming early in life. *Lancet* 353, 167-168
- 6 Ostman, S., Rask, C., Wold, A.E., Hultkrantz, S., and Teleme, E. (2006) Impaired regulatory T cell function in germ-free mice. *Eur J Immunol* 36, 2336-2346
- 7 FAO/WHO (2001) Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 34
- 8 Wells, J.M. (2011) Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb Cell Fact* 10 Suppl 1, S17
- 9 Strobel, S. (2001) Immunity induced after a feed of antigen during early life: oral tolerance vs. sensitisation. *Proc Nutr Soc* 60, 437-442
- 10 Yan, F. and Polk, D.B. (2002) Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 277, 50959-50965
- 11 Cukrowska, B., Lodinova-Zadnikova, R., Enders, C., Sonnenborn, U., Schulze, J., and Tlaskalova-Hogenova, H. (2002) Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scand J Immunol* 55, 204-209
- 12 Fedorak, R.N. and Madsen, K.L. (2004) Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders. *Curr Opin Gastroenterol* 20, 146-155
- 13 Ruiter, B. and Shreffler, W.G. (2012) Innate immunostimulatory properties of allergens and their relevance to food allergy. *Semin Immunopathol* 34, 617-632
- 14 Paschke, A. (2009) Aspects of food processing and its effect on allergen structure. *Mol Nutr Food Res* 53, 959-962
- 15 Daniel, C., Repa, A., Wild, C., Pollak, A., Pot, B., Breiteneder, H., Wiedermann, U., and Mercenier, A. (2006) Modulation of allergic immune responses by mucosal application of recombinant lactic acid bacteria producing the major birch pollen allergen Bet v 1. *Allergy* 61, 812-819
- 16 Tučková, L., Novotná, J., Novák, P., Flegelová, Z., Květoň, T., Jelínková, L., Zídek, Z., Man, P., and Tlaskalová-Hogenová, H. (2002) Activation of macrophages by gliadin fragments: isolation and characterization of active peptide. *J Leuk Biol* 71, 625-631
- 17 Schabussova, I., Hufnagl, K., Tang, M.L., Hoflehner, E., Wagner, A., Loupal, G., Nutten, S., Zuercher, A., Mercenier, A., and Wiedermann, U. (2012) Perinatal maternal administration of *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 prevents allergic inflammation in a mouse model of birch pollen allergy. *PLoS One* 7, e40271
- 18 Repa, A., Kozakova, H., Hudcovic, T., Stepankova, R., Hrcir, T., Tlaskalova-Hogenova, H., Pollak, A., and Wiedermann, U. (2008) Susceptibility to nasal and oral tolerance induction to the major birch pollen allergen Bet v 1 is not dependent on the presence of the microflora. *Immunology Letters* 117, 50-56
- 19 Wiedermann, U., Jahn-Schmid, B., Bohle, B., Repa, A., Renz, H., Kraft, D., and Ebner, C. (1999) Suppression of antigen-specific T- and B-cell responses by intranasal or oral administration of recombinant bet v 1, the major birch pollen allergen, in a murine model of type I allergy. *J Allergy Clin Immunol* 103, 1202-1210

- 20 Kessler, M., Acuto, O., Storelli, C., Murer, H., Muller, M., and Semenza, G. (1978) A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. Their use in investigating some properties of D-glucose and choline transport systems. *Biochim Biophys Acta* 506, 136-154
- 21 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275
- 22 Kozakova, H., Kolinska, J., Lojda, Z., Rehakova, Z., Sinkora, J., Zakostelecka, M., Splichal, I., and Tlaskalova-Hogenova, H. (2006) Effect of bacterial monoassociation on brush-border enzyme activities in ex-germ-free piglets: comparison of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains. *Microbes Infect* 8, 2629-2639
- 23 Zakostelska, Z., Kverka, M., Klimesova, K., Rossmann, P., Mrazek, J., Kopecny, J., Hornova, M., Srutkova, D., Hudcovic, T., Ridl, J., and Tlaskalova-Hogenova, H. (2011) Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. *PLoS One* 6, e27961
- 24 Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., and Axelsson, L. (2012) In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 153, 216-222
- 25 Macpherson, A.J. and Uhr, T. (2004) Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303, 1662-1665
- 26 Mowat, A.M. (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331-341
- 27 Wells, J.M. and Mercenier, A. (2008) Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6, 349-362
- 28 Feleszko, W., Jaworska, J., Rha, R.D., Steinhausen, S., Avagyan, A., Jaudszus, A., Ahrens, B., Groneberg, D.A., Wahn, U., and Hamelmann, E. (2007) Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy* 37, 498-505
- 29 Hazebrouck, S., Oozeer, R., Adel-Patient, K., Langella, P., Rabot, S., Wal, J.M., and Corthier, G. (2006) Constitutive delivery of bovine beta-lactoglobulin to the digestive tracts of gnotobiotic mice by engineered *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol* 72, 7460-7467
- 30 Dahlman, A., Ahlstedt, S., Hanson, L.A., Telemo, E., Wold, A.E., and Dahlgren, U.I. (1992) Induction of IgE antibodies and T-cell reactivity to ovalbumin in rats colonized with *Escherichia coli* genetically manipulated to produce ovalbumin. *Immunology* 76, 225-228
- 31 Zhang, L.L., Chen, X., Zheng, P.Y., Luo, Y., Lu, G.F., Liu, Z.Q., Huang, H., and Yang, P.C. (2010) Oral *Bifidobacterium* modulates intestinal immune inflammation in mice with food allergy. *J Gastroenterol Hepatol* 25, 928-934
- 32 Rigaux, P., Daniel, C., Hisbergues, M., Muraille, E., Hols, P., Pot, B., Pestel, J., and Jacquet, A. (2009) Immunomodulatory properties of *Lactobacillus plantarum* and its use as a recombinant vaccine against mite allergy. *Allergy* 64, 406-414
- 33 Schwarzer, M., Repa, A., Daniel, C., Schabussova, I., Hrcir, T., Pot, B., Stepankova, R., Hudcovic, T., Pollak, A., Tlaskalova-Hogenova, H., Wiedermann, U., and Kozakova, H. (2011) Neonatal colonization of mice with *Lactobacillus plantarum* producing the aeroallergen Bet v 1 biases towards Th1 and T-regulatory responses upon systemic sensitization. *Allergy* 66, 368-375
- 34 Konieczna, P., Groeger, D., Ziegler, M., Frei, R., Ferstl, R., Shanahan, F., Quigley, E.M., Kiely, B., Akdis, C.A., and O'Mahony, L. (2012) *Bifidobacterium infantis* 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Gut* 61, 354-366
- 35 Jeon, S.G., Kayama, H., Ueda, Y., Takahashi, T., Asahara, T., Tsuji, H., Tsuji, N.M., Kiyono, H., Ma, J.S., Kusu, T., Okumura, R., Hara, H., Yoshida, H., Yamamoto, M., Nomoto, K., and Takeda, K. (2012) Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathog* 8, e1002714
- 36 Savage, J.H., Matsui, E.C., Skripak, J.M., and Wood, R.A. (2007) The natural history of egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 120, 1413-1417
- 37 Yang, M., Yang, C., and Mine, Y. (2010) Multiple T cell epitope peptides suppress allergic responses in an egg allergy mouse model by the elicitation of forkhead box transcription factor 3- and transforming growth factor-beta-associated mechanisms. *Clin Exp Allergy* 40, 668-678

## 8. SEZNAM PUBLIKACÍ

### 8.1 Publikace *in extenso* vztahující se k dané dizertační práci

Cukrowska B, Motyl I, Kozakova H, **Schwarzer M**, Gorecki RK, Klewicka E, Slizewska K, Libudzisz Z: Probiotic *Lactobacillus* strains: *in vitro* and *in vivo* studies. *Folia Microbiol* (Praha) 2009;54:533-537.

IF2009=0.978

**Schwarzer M**, Repa A, Daniel C, Schabussova I, Hrnčíř T, Pot B, Stepankova R, Hudcovic T, Pollak A, Tlaskalova-Hogenova H, Wiedermann U, Kozakova H: Neonatal colonization of mice with *Lactobacillus plantarum* producing the aeroallergen Bet v 1 biases towards Th1 and T-regulatory responses upon systemic sensitization. *Allergy* 2011;66:368-375.

IF2010= 6.297

**Schwarzer M**, Srutkova D, Schabussova I, Hudcovic T, Ankguen J, Wiederman U, Kozakova H: Neonatal colonization of germ-free mice with *Bifidobacterium longum* prevents allergic sensitization to Bet v 1. Manuscript in preparation

Golias J, **Schwarzer M**, Wallner M, Kverka M, Kozakova H, Srutkova D, Klimesova K, Sotkovsky P, Palova-Jelinkova L, Ferreira F, Tuckova L: Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy. *PLoS ONE* 2012;7(5): e37156. doi:10.1371/journal.pone.0037156

IF2011= 4.092

### 8.2 Publikace *in extenso* nevztahující se k dané dizertační práci

Hudcovic T, Kolinska J, Klepetar J, Stepankova R, Rezanka T, Srutkova D, **Schwarzer M**, Erban V, Du Z, Wells JM, Hrnčíř T, Tlaskalova-Hogenova H, Kozakova H: Protective effect of *Clostridium tyrobutyricum* in acute dextran sodium sulphate-induced colitis: differential regulation of tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-18 in BALB/c and severe combined immunodeficiency mice. *Clin Exp Immunol* 2012;167(2):356-65.

IF2011= 3.36

Srutkova D, Spanova A, Spano M, Drab V, **Schwarzer M**, Kozakova H, Rittich B: Efficiency of PCR-based methods in discriminating *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* and *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* strains of human origin. *J Microbiol Methods* 2011;87(1):10-6.

IF2010= 2.018

Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Kozakova H, Hudcovic T, Vannucci L, Tuckova L, Rossmann P, Hrcir T, Kverka M, Zakostelska Z, Klimesova K, Pribylova J, Bartova J, Sanchez D, Fundova P, Borovska D, Srutkova D, Zidek Z, **Schwarzer M**, Drastich P, Funda DP: The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol* 2011;8:110-120.

IF2010= 2.026

Stepankova R, Tonar Z, Bartova J, Nedorost L, Rossmann P, Poledne R, **Schwarzer M**, Tlaskalova-Hogenova H: Absence of microbiota (germ-free conditions) accelerates the atherosclerosis in ApoE-deficient mice fed standard low cholesterol diet. *J Atheroscler Thromb* 2010;17:796-804.

IF2009= 3.048

Cukrowska B, Rosiak I, Klewicka E, Motyl I, **Schwarzer M**, Libudzisz Z, Kozakova H: Impact of heat-inactivated *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* strains on cytokine responses in whole blood cell cultures of children with atopic dermatitis. *Folia Microbiol (Praha)* 2010;55:277-280.

IF2009=0.978

Kolinska J, Zakostelecka M, **Schwarzer M**, Stepankova R, Hudcovic T, Kozakova H: Effect of nonpathogenic *Escherichia coli* monoassociation on small intestinal brush border glycoconjugate moieties and cytokine production after colonization in ex germ free rats and pigs. *Int J Interferon Cytokine Mediator Res* 2010;2:73-84.

IF2009=0

Kozakova H, Repa A, **Schwarzer M**, Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Hudcovic T, Wiedermann U: The role of gut microflora in mucosal tolerance induction to birch pollen in mouse allergy model. In: Hejdy P. J., Hanson L.A., Tlaskalova-Hogenova H. and Rusch V. (Eds.), Old Herborn University Seminar Monograph. 1. Old Herborn University, 2009, s. 11-19.