



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VYTIPOVÁNÍ A SLEDOVÁNÍ EXPRESE GENŮ
OVLIVŇUJÍCÍCH SYNTÉZU KYSELINY
HYALURONOVÉ VE STREPTOCOCCUS EQUI
SUBSP. ZOOEPIDEMICUS POMOCÍ
TECHNOLOGIE DNA ČIPŮ A REAL TIME PCR**

STUDYING OF GENE EXPRESSION INVOLVED IN HYALURONIC ACID
SYNTHESIS IN STREPTOCOCCUS EQUI SUBSP. ZOOEPIDEMICUS USING DNA
MICROARRAYS AND REAL-TIME PCR

AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Radka Hrudíková

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc.

BRNO 2020

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1	Kyselina hyaluronová (HA)	2
2.1.1	<i>Historie objevu a produkce HA</i>	3
2.1.2	<i>Mikrobiální produkce</i>	3
2.2	Biosyntéza HA ve <i>S. zooepidemicus</i>	4
2.2.1	<i>has operon</i>	5
2.2.2	<i>HA syntáza</i>	6
3	DISKUZE NEJVÝZNAMNĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ	10
3.1	Sekvenace chromozomální DNA <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> CO4A	10
3.2	Analýza genomu kmene CO4A	10
3.3	Sledování exprese genů za pomoci DNA čipů	15
3.3.1	<i>Metabolické dráhy aminocukrů a nukleotidů</i>	15
3.3.2	<i>Geny has operonu a vybrané geny související s produkcí HA</i>	19
3.4	Sledování exprese vybraných genů pomocí metody qPCR	24
3.4.1	<i>Ověření exprese genů has operonu</i>	24
3.4.2	<i>Vliv N-acetylglukosaminu na expresi vybraných skupin genů</i>	26
3.4.3	<i>Výtěžek HA z kultivací</i>	30
4	ZÁVĚR	33
5	PŘEHLED LITERATURY	35
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	40
7	STRUČNÝ ŽIVOTOPIS AUTORA	41
8	SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA	42

1 ÚVOD

Česká biotechnologická společnost Contipro a.s. se zabývá produkcí a využitím kyseliny hyaluronové (HA) pro kosmetický a farmaceutický průmysl. HA má široké využití především proto, že je přirozenou součástí mezibuněčné hmoty živých organismů a hlavně člověka. Navíc má hydrofilní vlastnosti a biologické účinky (regenerace pokožky, hojení ran aj.), díky kterým je právě využívána ve farmaceutických a kosmetických přípravcích. Společnost k její produkci využívá bakteriálního kmene *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, který je jejím přirozeným producentem. HA u tohoto bakteriálního kmene představuje jeden z nejdůležitějších virulentních faktorů. Kmen produkuje HA ve formě kapsule, která obaluje celý povrch bakterie a tím ji skrývá před buňkami imunitního systému napadeného organismu. Bakteriální kmen, který využívá k produkci společnost Contipro, byl získán náhodnou fyzikální mutagenezí a je nepatogenní (nehemolytický). Cílem této práce je především zmapování změn, ke kterým v genetické výbavě kmene došlo. Hlavním a nejvýraznějším důsledkem mutace kmene byla právě velmi vysoká produkce HA. Proto jsme se pokusili najít změny v genomu a spojit je s metabolickými drahami syntézy HA, aby bylo možné produkci ovlivňovat či cíleně upravovat. Ovlivňování její produkce přes cílené úpravy se stalo i nástrojem k prohloubení znalostí mechanismu tvorby tohoto virulentního faktoru a jeho významu pro růst buněk v laboratorních podmínkách [1, 2, 3, 4].

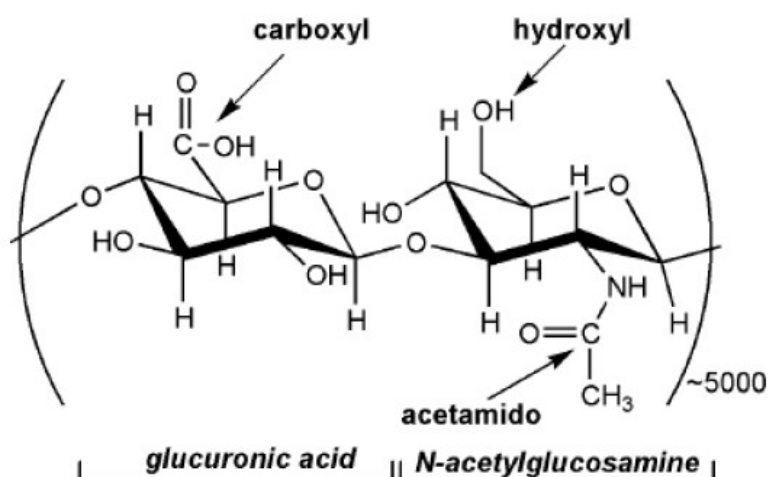
Aby byla problematika komplexně prostudována, byla velká část teorie věnována metabolickým drahám syntézy HA v bakteriálním druhu *S. zooepidemicus* a jejich regulačním mechanismům. Další kapitoly byly věnovány metodám, kterými byly tyto dráhy studovány na základě genové exprese. Prvním krokem bylo zjištění sekvence celého genomu kmene studovaného a referenčního metodou celogenomové sekvenace. Následovala analýza získaných dat s vyhledáváním variant. Dále byly provedeny kontrolní kultivace a odběry pro izolaci RNA, která byla použita pro transkriptomickou analýzu metodou DNA čipů a qPCR.

Poslední část práce byla zaměřena na sledování změn exprese genů u metabolických drah, které jsou přímo či nepřímo zapojeny v produkci kyseliny hyaluronové, nebo ji mohou výrazně ovlivnit. Jednalo se především o dráhy syntézy buněčné stěny, peptidoglykanu a glykolýzy. Na základě výsledků publikovaných v roce 2013 v Austrálii [5] jsme se rozhodli inspirovat se jejich experimentem a ověřit vliv suplementace kultivačního média *N*-acetylglukosaminem (GlcNAc) na biosyntézu HA u kmene ATCC35246. GlcNAc je jedním z prekurzorů syntézy HA a jeho suplementace měla dle výše uvedené studie pozitivní dopad na její produkci. Výsledky získané molekulárně-biologickými metodami jsou doplněné analýzou výtěžku HA z experimentálních kultivací.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kyselina hyaluronová (HA)

HA je přirozeně se vyskytující glykosaminoglykan, který nabízí mnoho jedinečných výhod jako stavební jednotka pro biomateriály. V lidském těle se vyskytuje ve formě hyaluronátu sodného. Při fyziologickém pH existuje v náhodném klubkovitém uspořádání [6]. Nejvyšší koncentrace HA v lidském těle můžeme zaznamenat v kůži, v pupeční šňůře či ve sklivci očí. V mikrobiální říši se s HA nejčastěji setkáváme jako s extracelulární kapsulí některých druhů bakterií rodu *Streptococcus* (např. *S. zooepidemicus*, *S. pyogenes*, *S. equisimilis*) [7]. Je to neimunogenní enzymaticky degradovatelný lineární polysacharid o vysoké molekulové hmotnosti (4 000-8 000 000 Da) [8], skládající se z disacharidických jednotek, které jsou tvořeny D-glukuronovou kyselinou (GlcUA) a N-acetylglukosaminem (GlcNAc) spojenými β -1-3 a β -1-4 glykosidickou vazbou (obr. 1) [9]. Do skupiny glykosaminoglykanů patří dále například chondroitin sulfát, dermatan sulfát a heparan sulfát. Kyselina hyaluronová neobsahuje na rozdíl od ostatních ze skupiny sulfátovou skupinu a interaguje nekovalentně s komplexy proteinů. Stále více se dozvídáme o biologických funkcích HA, které jsou zprostředkovány specifickými receptory na povrchu buněk, jako jsou CD44 a RHAMM [10]. Vysoká koncentrace HA je zaznamenávána v oblastech proliferace a migrace buněk, dále je důležitá pro morfogenezi a regeneraci tkání [9].



Obrázek 1: Struktura kyseliny hyaluronové [9].

HA má významnou roli v mnoha procesech zahrnujících například angiogenezi, homeostázy, hojení ran a podobně. Ve vysoké koncentraci je přítomna v extracelulární matrix. Svými vlastnostmi si našla široké uplatnění v kosmetickém průmyslu, biomedicině, farmacii a potravinářském průmyslu. Komerční produkce je zaměřena na široké spektrum použití jak HA, tak jejích derivátů (př. oční operace) [6]. V současnosti se výzkum HA rozšiřuje i do oborů jako jsou nanotechnologie, nanomedicína, tkáňové inženýrství, metabolické inženýrství a podobně [11]. Tradičním způsobem získávání HA byla extrakce z kohoutích hřebínků, teď se vyrábí především mikrobiální produkcí s nízkou produkční cenou a menším dopadem na životní prostředí [12]. Je úspěšně produkována v průmyslovém měřítku zejména vhodnými bakteriálními kmeny rodu *Streptococcus*, které mají vysokou výtěžnost a nízké náklady na kultivační podmínky.

2.1.1 Historie objevu a produkce HA

V roce 1934 Karl Meyer a John Palmer popsali nový polysacharid izolovaný z bovinního sklivce očí. Našli látku obsahující uronovou kyselinu a aminosacharid, kterou pojmenovali hyaluronová kyselina jako spojení slov hyaloid (sklivec) a uronová kyselina. Dále také popsali její chemickou strukturu [13].

Termín hyaluronan byl však zaveden až roku 1986. V letech 1930–1940 byla HA izolována z mnoha různých zdrojů, od sklivce a kohoutích hřebínků po bakterie rodu *Streptococcus*. Fyzikálně chemická charakterizace kyseliny hyaluronové byla provedena v období 1950–1960. Výzkumníci zjistili extrémně vysokou viskozitu při velmi nízké koncentraci a výjimečné rheologické vlastnosti. Díky tomu HA může sloužit jako lubrikant, stabilizátor struktur, regulátor obsahu vody a může tvořit hydrogely. Viskoelastické vlastnosti jsou kontrolovány koncentrací a molekulovou hmotností použité kyseliny hyaluronové [14, 15]. Původní HA jako produkt použitelný v medicíně a farmacii byl připraven Endre A. Balazsem, který připravil první nezápálivou a vysoce čistou vysokomolekulární HA z pupečních šňůr a kohoutích hřebínků [16]. Začátkem osmdesátých let byla HA poprvé použita k vytvoření nitroočních čoček pro implantaci. Po tomto úspěchu se stala hlavním materiálem používaným k očním operacím [16].

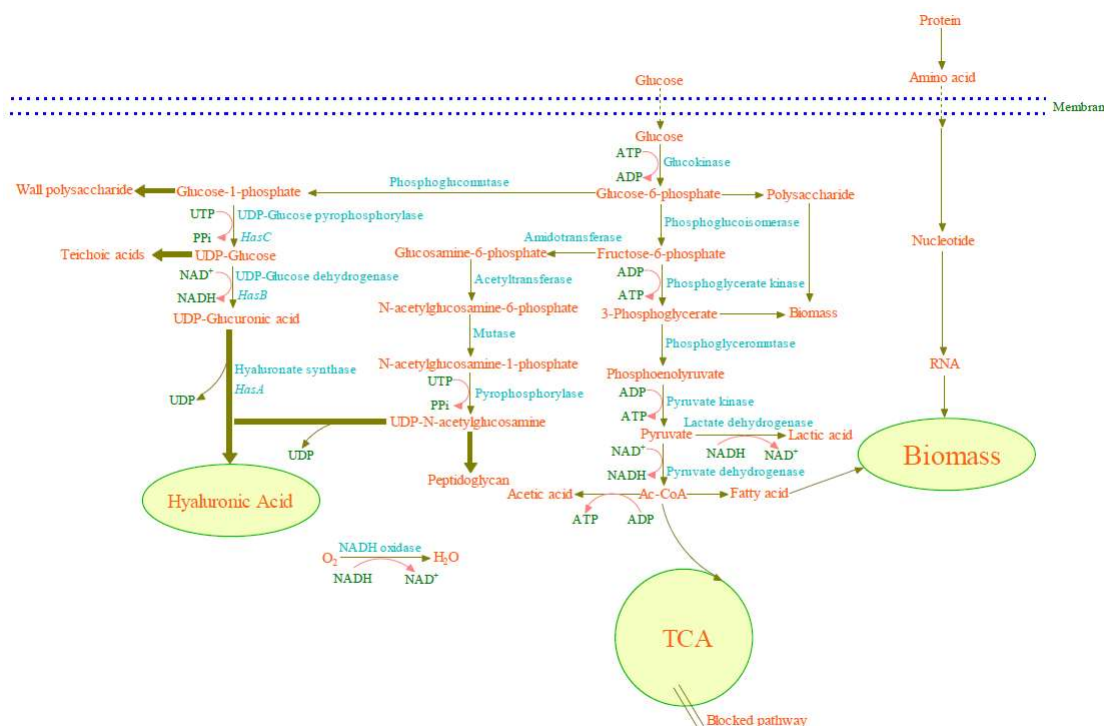
Extrakce kyseliny hyaluronové z kohoutích hřebínků postupem času přestala stačit poptávce na trhu a především požadavkům nových biomedicínských a farmaceutických aplikací. Jako alternativní produkce kyseliny hyaluronové byla zavedena mikrobiální fermentace [3, 17]. První fermentačně připravená HA pro komerční účely byla produkována bakteriálním druhem *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, který zůstává nejpoužívanějším v industriální produkci. Po kmenech rodu *Streptococcus* lze HA produkovat i v jiných bakteriích, jak přirozenou cestou s nižší účinností, tak za pomoci metod metabolického a genového inženýrství. Můžeme uvést jak Gram negativní bakterie (*Agrobacterium sp.*, *Escherichia coli*), tak i Gram pozitivní (*Bacillus sp.*, *Lactococcus lactis*) [18, 19, 20, 21, 22].

2.1.2 Mikrobiální produkce

Kyselina hyaluronová získávaná extrakcí z kohoutích hřebínků nebo bovinního sklivce tvoří komplex s proteoglykany. Je proto složité izolovat vysokomolekulární HA, jelikož několikanásobná extrakce způsobuje nežádoucí redukci molekulové hmotnosti. Velmi důležitým faktorem je také využívání živočišného produktu k léčbě lidí a s tím spojená rizika imunitní odpovědi, virové infekce a podobně. Proto se průmysl přiklonil k mikrobiální produkci. Bakteriální kmeny produkují HA jako extracelulární polysacharid, který je nekovalentně vázaný k buněčné stěně a může být vlivem vnějšího prostředí uvolňován do živného média. Množství tohoto polymeru produkovaného bakteriální fermentací může být teoreticky neomezené. Prakticky je to už komplikovanější. S přibývajícím produktem roste viskozita média, mění se pH kultivačního prostředí a dochází i k dalším změnám v průběhu fermentace, které vedou ke zpomalení či zastavení syntézy [23].

Bakteriální kmeny produkují HA nejčastěji ve formě mukoidní kapsule pokrývající celou buňku. Kapsule je biokompatibilní s hostitelským organismem a je jedním z faktorů virulence [24, 25]. Chrání bakteriální buňku před působením buněk imunitního systému a zvyšuje její přilnavost ke sliznicím hostitelského organismu [26]. Ve kmenech rodu *Streptococcus* je HA produkována jako sekundární metabolit a není tedy přímo zapojená v procesu růstu, vývoje, nebo rozmnožování buňky. Její produkce je podmíněna geneticky a může být ovlivněna nutričními i dalšími faktory. Běžně používaný *S. zooepidemicus* (přirozený producent) může vyprodukovat až 6 g/l HA za vhodných kultivačních podmínek a v závislosti na vybraném kmenu. Vysoká viskozita roztoku i s nízkou koncentrací HA způsobuje komplikace spojené s mícháním a vzdušením fermentačních reaktorů. Z hlediska

metabolismu zde soupeří o společné prekurzory (UDP-GlcNAc a UDP-GlcUA) metabolické dráhy syntézy HA a buněčného růstu (energetický metabolismus, biosyntéza peptidoglykanu a polysacharidů buněčné stěny). Posledním významným faktorem je syntéza kyseliny mléčné, která je produktem metabolismu cukrů. Její vysoká koncentrace (až 65 g/l [27]) vede k silné inhibici buněčného růstu a produkce HA, tím že snižuje hodnotu pH, čímž deprimuje metabolismus. Kontinuální úprava pH zase zvyšuje koncentraci solí v médiu a mění osmotické prostředí buňky [7]. Souhrnný přehled metabolických drah, propojených s metabolickou dráhou produkce kyseliny hyaluronové je uveden na obr. 2.



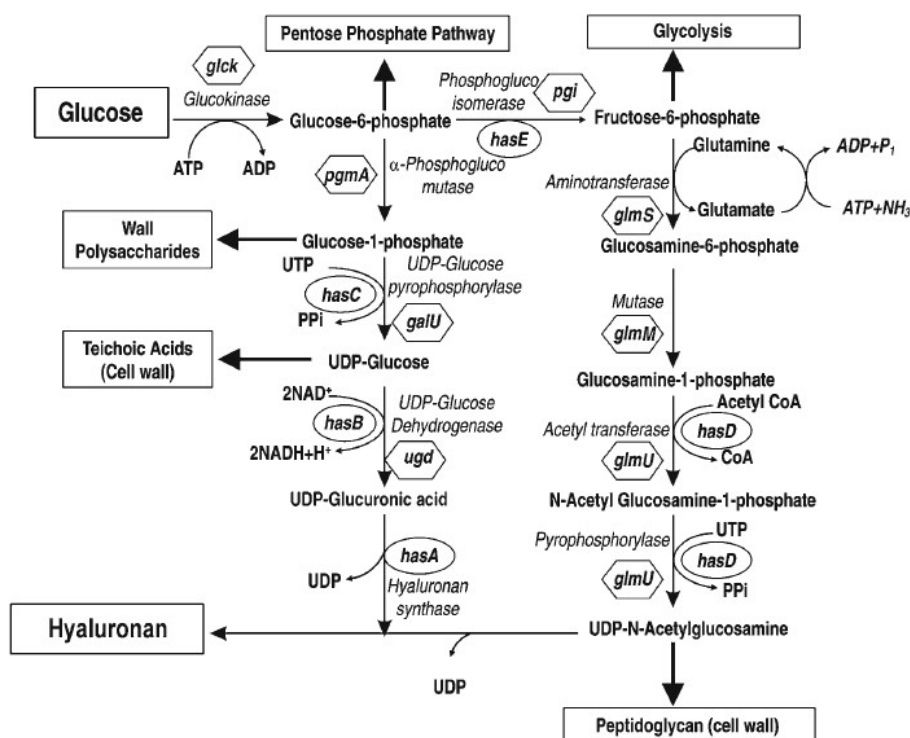
Obrázek 2: Souhrnný přehled propojení metabolických drah zapojených v produkci HA [7].

2.2 Biosyntéza HA ve *S. zooepidemicus*

Kyselina hyaluronová je derivátem monosacharidických jednotek GlcNAc a GlcUA. Syntéza HA je rozdělena do tří fází. V první fázi se syntetizuje UDP-glukuronová kyselina (UDP-GlcUA). Glukóza-6-fosfát je konvertován α -fosfoglukomutázou (*PgmA*) na glukóza-1-fosfát reverzibilní reakcí. UDP-glukóza pyrofosforyláza (*GalU*) následně katalyzuje reakci UTP a glukózy-1-fosfátu za vzniku UDP-glukózy. UDP-glukuronová kyselina je získána specifickou oxidací primární alkoholové skupiny na UDP-glukóze katalyzované UDP-glukóza dehydrogenázou (*Ugd*) [9].

Druhá fáze je zodpovědná za syntézu UDP-*N*-acetylglukosaminu (UDP-GlcNAc) a začíná reakcí fruktózy-6-fosfátu. Aminoskupina z glutaminu je přenesena na fruktózu-6-fosfát za katalýzy amidotransferázou (*GlmS*) a za vzniku glukosamino-6-fosfátu. Následující krok je velmi energeticky náročný. Fosfátové skupiny jsou přeskupeny za působení mutázy (*GlmM*), což vede ke vzniku *N*-acetylglukosamin-1-fosfátu. Následně je acetylová skupina přesunuta na glukosamin-6-fosfát za pomoci acetyltransferázy a za vzniku *N*-acetyl glukosaminu-6-fosfátu. Nakonec za katalýzy pyrofosforylázou (bifunkční enzym *GlmU*) UTP reaguje s *N*-acetyl-glukosamin-1-fosfátem a vzniká UDP-GlcNAc.

Ve třetí fázi jsou nasyntetizované aktivované prekurzory spojovány HA syntázou (*HasA*) do konečné struktury kyseliny hyaluronové (obr. 3) [9].



Obrázek 3: Biosyntéza HA ve *S. zooepidemicus* [20].

Celkové množství ATP spotřebované na přípravu 1 molu disacharidických jednotek HA jsou 4 moly, z toho 2 moly ATP jsou spotřebovány ve dvou glukokinázových reakcích a 2 moly ATP jsou spotřebovány na regeneraci donorových UTP. Oxidační reakce katalyzovaná UDP-glukóza dehydrogenázou uvolňuje 2 moly NADH na 1 mol nasyntetizovaných HA disacharidických jednotek [9].

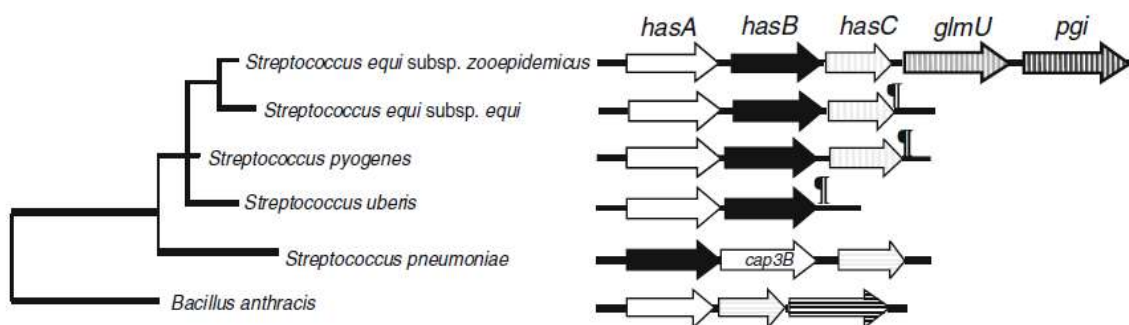
Tři klíčové enzymy jsou zapojeny do první části dráhy – konverze glukózy-6-fosfátu na UDP-glukuronovou kyselinu. Jsou to fosfoglukomutáza (gen *pgmA*), UDP-glukóza pyrofosforyláza (geny *hasC*, nebo *galU*) a v neposlední řadě UDP-glukóza dehydrogenáza (geny *hasB*, nebo *ugd*). Kritickými enzymy pro syntézu druhého prekursoru – UDP-*N*-acetylglukosaminu – jsou fosfoglukoizomeráza (geny *hasE*, nebo *gpi*) a bifunkční enzym glukosamin-1-fosfát acetyltransferáza/*N*-acetylglukosamin-1-fosfát uridylyltransferáza (geny *hasD*, nebo *glmU*). Iniciační molekuly (prekursor) pro syntézu HA jsou také intermediáty tvorby buněčné stěny a mohou být rovněž zpracovány glykolýzou či pentózovým cyklem [28].

2.2.1 *has operon*

Enzymy, zapojené do metabolické dráhy kyseliny hyaluronové, jsou u streptokoků kódovány *has* operonem. Počet genů, z nichž se *has* operon skládá, se může lišit od 3 do 5 u různých kmenů [29]. U přirozeného producenta kyseliny hyaluronové *S. zooepidemicus* ATCC35246 a příbuzných kmenů (*S. zooepidemicus* H70, *S. zooepidemicus* MGCS10565) je všech pět genů (*hasA*, *hasB*, *hasC*, *hasD*, *hasE*) lokalizováno na stejném lokusu genomu v *has* operonu. Transkripce těchto genů je pod kontrolou místa počátku transkripce a σ^{70} promotoru umístěného 50 bp před *hasA* [30, 31, 9]. Tyto kmeny mají ve svém genomu také jednu kopii *hasC* genu navíc. Kopie *hasC* byla nalezena v *gps* operonu obsahujícím pouze dva geny: *hasC* a *gpsA* gen, který kóduje NAD(P)⁺ dependentní glycerol-3-fosfát dehydrogenázu. Dodatečná kopie *hasC* má za následek stabilizaci a zlepšení produkce HA v buňkách [29]. Bylo prokázáno, že biosyntéza HA je v buňkách *Streptococcus sp.* kontrolována na úrovni transkripce silou

promotoru *has* operonu a regulována dvousložkovým regulačním systémem *csrS/csrR* (respektive *arlS/R*, nebo *covR/S*) [32, 33, 4].

Byly charakterizovány *has* operony dvou patogenních zástupců *S. zooepidemicus* a *S. equi*, které jsou využívány ke komerční produkci HA [30]. Dále byla zkoumána skladba genů *has* operonu u těchto kmenů i s dalšími kmeny rodu *Streptococcus* a některými kmeny rodu *Bacillus*, který přirozeně formuje kapsuli z poly-D-gamma-glutamové kyseliny. Příbuznost operonů je naznačena na obrázku 4 evolučním distančním dendrogramem (Kimurův dvouparametrový model), založeným na analýze 16S rRNA. Dále je na schématu naznačeno uspořádání genů *has* operonu u *S. equi* subsp. *zooepidemicus* [30].



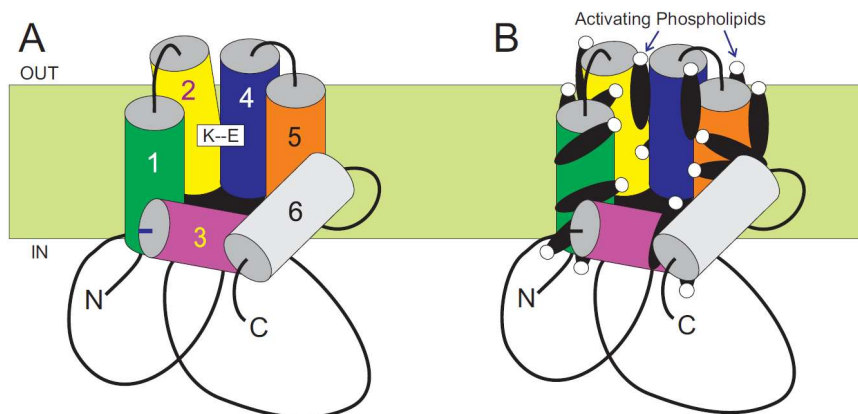
Obrázek 4: Skladba *has* operonu u *S. equi* subsp. *zooepidemicus* a dalších kmenů rodu *Streptococcus*, navíc se skladbou genů identifikovaných u *Bacillus anthracis* [30].

Gen *gpi* kóduje fosfoglucoizomerázu, která je pro růst bakterií na sacharidech jako uhlíkovém zdroji esenciální. Není ovšem esenciální pro produkci HA a proto je vhodná samostatná regulace transkripce *has* operonu a *gpi*. V té by mohl hrát roli silně konzervovaný σ^{70} promotor před *gpi*, který naznačuje, že tento gen je pod kontrolou alespoň dvou promotorů [30].

2.2.2 HA syntáza

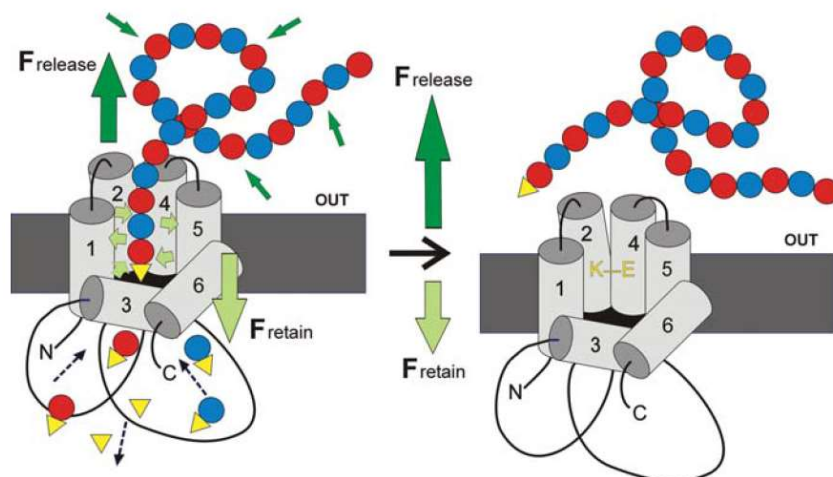
Hyaluronan syntáza (HAS) je enzym kódovaný *hasA* genem umístěným na začátku *has* operonu a je esenciální pro produkci kyseliny hyaluronové. Existují dvě nepříbuzné skupiny HA syntáz [34]. Syntázy, které nacházíme u obratlovců a mimo jiné u bakterií rodu *Streptococcus*, patří do skupiny HAS I. HA syntázy, izolované z bakterie *Pasteurella multocida*, jsou řazeny do skupiny HAS II. Skupina HAS I se dále dělí na dvě podskupiny podle směru polymerizace: podskupinu HAS I-R u níž probíhá polymerizace od redukujícího konce (streptokokální, myší a lidská HA) a podskupinu HAS I-N, u níž probíhá polymerizace od neredukujícího konce, patří sem např. HAS z *Xenopus leavis* [35]. Syntázy třídy HAS I patří do GT2 skupiny glykozyl transferáz, která zahrnuje i β -glykozyl transferázy jako jsou celulóza syntáza a chitin syntáza [35]. Skupina HAS II je poněkud odlišná od ostatních syntáz. Polymerizace probíhá sice od neredukujícího konce (stejně jako u HAS I-N skupiny), ale vyskytují se především u Gram-negativních bakterií [35].

HA je u streptokoků syntetizována na cytoplasmatické membráně pomocí membránově asociované procesivní syntázy (obr. 5) se čtyřmi transmembránovými a dvěma k membráně asociovanými doménami [36, 37, 38, 39]. HAS je lipid-dependentní integrální protein a pro jeho aktivitu jsou vyžadovány specifické fosfolipidy tzv. kardiolipiny. Funkční katalytickou jednotkou je HAS monomer tvořící komplex se šestnácti kardiolipinovými molekulami [35, 40].



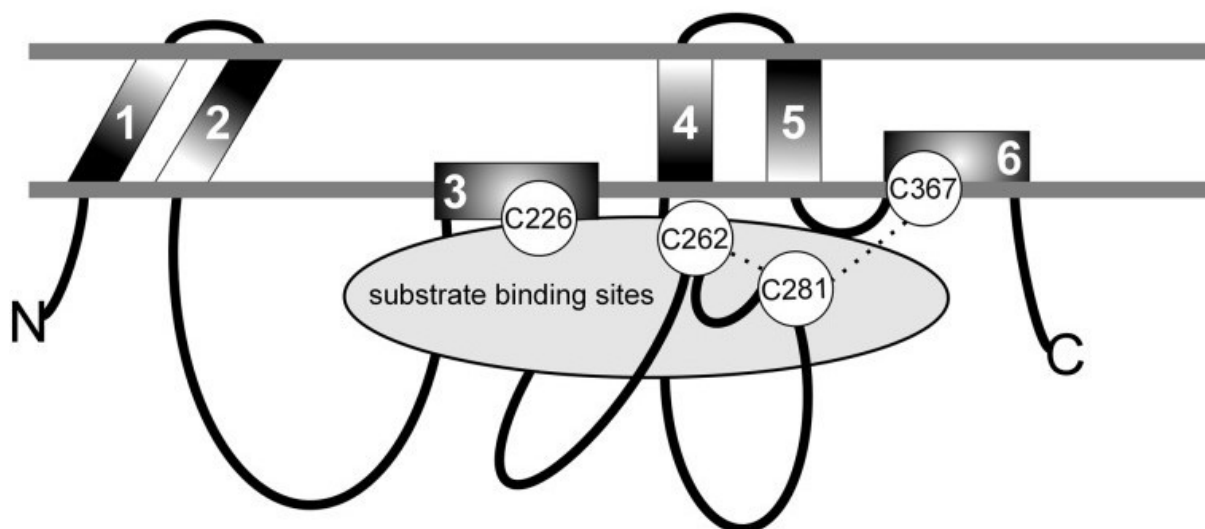
Obrázek 5: **(A)** Navrhované uspořádání transmembránových a membránově asociovaných domén HAS u *S. equi* subsp. *zooepidemicus* ve své neaktivní formě bez zakomplexování s kardiopolipiny. Domény 1 a 2 a domény 4 a 5 jsou spojeny krátkými extracelulárními smyčkami, tudíž jsou asociovány jako sousední domény [37]. Dvojice polárních reziduí naznačenými v bílém rámečku K^{48} a E^{327} zprostředkovává interakce mezi těmito sousedními doménami. Domény 3 a 6 mohou být rozmístěny tak, jak je uvedeno na obrázku, nebo si mohou své pozice vyměnit [41]. **(B)** Navrhované uspořádání transmembránových a membránově asociovaných domén HAS u *S. equi* subsp. *zooepidemicus* ve své aktivní formě – tvoří komplex s fosfolipidy (černě vyznačeny s bílou „hlavičkou“). Fosfolipidy se aktivně zapojují do tvorby póru, kterým je zřejmě HA translokována přes membránu ven z buňky [42] [převzato z 35].

Syntéza HA probíhá *de-novo* prodlužováním polymeru z jeho redukujícího konce [43]. Nejsou tvořeny žádné kovalentně napojené intermediáty. Mechanismus translokace řetězce polymeru přes plazmatickou membránu, stejně jako zakončení polymerizace, není ještě zcela objasněn. Žádný přímý důkaz o zapojení HAS do translokace HA řetězce neexistuje, nicméně zapojení ABC transportéru bylo vyloučeno [9]. Zatím byla jen vyslovena hypotéza, že HA řetězec je extrudován skrze pór formovaný samotnou HA syntázou a terminace nastává stříhovou silou, která řetězec HA tlačí pryč od hyaluronan syntázy [42, 44]. Rostoucí řetězec zůstává připojený k HAS na buněčné membráně a zároveň je extrudován do extracelulárního prostoru (obr. 6). Vyslovená teorie může být odpovědí na otázku, jak HAS reguluje velikost HA a jak může být komplex HAS-UDP-HA (UDP – uridin difosfát) stabilní až několik hodin [39].



Obrázek 6: HA – HAS retain/release model kontroly velikosti produktu u hyaluronan syntáz skupiny I. Levé schéma zobrazuje šest membránových domén HAS (šedé válce) tvořící pór, který obklopuje a váže rostoucí HA řetězec [45]. HA řetězec je tvořen střídavě GlcUA (červený kruh) a GlcNAc (modrý kruh), ke kterým je vázán UDP (žlutý trojúhelník) z redukujícího konce. Malé černé šipky ukazují zásobování aktivního místa substrátem UDP-GlcUA a UDP-GlcNAc, přičemž UDP reakční produkt je z místa odváděn. Malé světle zelené šipky naznačují působení sil, které se podílejí na udržení HA-HAS komplexu pohromadě (interakce s fosfolipidy, s cysteinovými rezidui a jiné). Působení těchto sil je znázorněno velkou světle zelenou šipkou. Malé tmavě zelené šipky zastupují interakce (vazba k externím proteinům, či matrix) a síly (střihová síla, rotační pohyb buňky, Brownův pohyb), které odlučují HA řetězec od HAS. Jejich působení je znázorněno jako velká tmavě zelená šipka nahoru. Síly udržující komplex HA – HAS pohromadě (F_{retain}) zůstávají po dobu syntézy HA více méně konstantní, zatímco síly odtrhávající HA řetězec od komplexu (F_{release}) přirozeně narůstají se zvětšující se velikostí řetězce. Na začátku polymerizace jsou F_{retain} mnohem větší než F_{release} , postupně se síly vyrovnávají, až v jistém momentu v průběhu elongace řetězce se stává F_{release} větší než F_{retain} . Dochází k odtržení řetězce HA od HAS a k uvolnění do extracelulárního prostoru (schéma vpravo). Odtržený řetězec HA je zobrazen s navázaným UDP, protože není jasné, zda je proces uvolnění řetězce asociován se ztrátou UDP. V pravé části obrázku jsou naznačena rezidua K^{48} v doméně 2 a E^{327} v doméně 4 (žlutá písmena). Rezidua se podílejí na silách udržujících komplex HA – HAS navázán [převzato z 39].

Ke stabilitě komplexu HAS-UDP-HA a regulaci velikosti HA přispívá i přítomnost cysteinových reziduí na HA syntáze. Membránově vázaná HAS má 4 cysteinová rezidua na pozicích 226, 262, 281 a 367. Cysteinová rezidua Cys²⁶², Cys²⁸¹ a Cys³⁶⁷ jsou umístěna velmi blízko sebe a společně s Cys²²⁶ jsou lokalizována na vnitřní straně membrány. Všechna tato rezidua jsou taktéž lokalizována velmi blízko UDP-prekurzor vazebného místa (obr. 7) [35].



Obrázek 7: Navrhované rozložení cysteinových reziduí a membránových domén kolem aktivního místa HAS [převzato z 39].

Ani jedno cysteinové reziduum není vyžadováno pro aktivitu HAS [39]. V předchozích letech byla tato rezidua studována na molekulární úrovni. Později byla snaha nahradit je serinovými a alaninovými rezidui na různých místech a sledovat vliv na velikost produkované HA [40, 46].

3 DISKUZE NEJVÝZNAMNĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ

3.1 Sekvenace chromozomální DNA *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* CO4A

Z kultury kmene CO4A byla izolována chromozomální DNA. Minimální doporučené množství DNA pro celogenomovou sekvenaci malých genomů (≤ 5 Mbp) je 250 ng. Množství našeho vzorku bylo stanoveno na 1 155 ng (23,11 ng/ μ l, celkový objem 50 μ l). Výsledné hodnoty relevantních poměrů absorpance při 230, 260 a 280 nm byly následující: $A_{260/280} = 1,85$ a $A_{260/230} = 2,09$.

DNA byla úspěšně osekvenována a data byla analyzována za pomoci softwaru. Sekvenace byla provedena v módu paired-end o délce čtení 150 bp. Délka sekvencí se pohybovala v rozmezí 35-151 bp (90 % sekvencí bylo delších než 140 bp). Množství sekvencí v páru bylo 7 632 658, tedy $2 \times 3\,816\,329$. Více než 90 % přečtených bází vykazovalo Q-score >30 , tedy správnost čtení vyšší než 99,9 %. Konečné výsledky byly dodány ve formě contigů o velikosti řádově od stovek párů bází po statisíce párů bází. Počet contigů pro kmen CO4A se lišil s použitým softwarem pro *de-novo* sestavení sekvenace (tab. 1). Contigy byly zapisovány do formátu FASTQ, který je kompatibilní s vyhledávacím a porovnávacím softwarem, který může být použit k sestavení celého genomu.

Tabulka 1: Rozdíly v počtu a délce contigů s použitým softwarem (kmen CO4A)

Software	Počet contigů	Nejdelší contig [bp]	Délka genomu [bp]
CLC Genomics Workbench	77	118733	2103015
Geneious	512	83112	2111453
Velvet	7382	68315	2205676
ABYSS	1434	68315	2149762
Minia	275	68315	2062678

Contigy měly překrývající se komplementární konce. Byla provedena analýza ručním vyhledáváním komplementárních konců a následné spojování contigů v programu ApE (A plasmid Editor, ApE 2020) [47] a doplněna softwarovou analýzou za použití volně dostupné webové aplikace BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [48]. Pomocí BLAST lze porovnávat genové sekvenace s on-line databází a nacházet tak homologní sekvenace v různých bakteriálních kmenech. Contigy byly srovnány s nejpodobnějším osekvenovaným kmenem a byla zjištěna jejich pravděpodobná pozice v genomu v porovnání s referenčním genomem. K bioinformatické analýze byla použita také volně dostupná verze programu Mauve [49], který sestaví contigy vůči referenčnímu genomu a graficky je zobrazí. Výsledkem byl kompletní genom kmene CO4A o velikosti 2 167 251 párů bází. Bylo identifikováno 1 999 kódujících oblastí a obsah bází GC byl 41,7 %.

Referencí byl genom kmene ATCC35246 [50], který je kmeni CO4A nejbližším příbuzným genomem (vykazuje 99,5% identitu). Jeho sekvenace je také dostupná v databázi NCBI [48]. Sekvenace byla provedena v roce 2011 týmem čínských vědců za použití platformy Roche 454 genome sequencer FLX systému a bylo získáno celkem 649 contigů [50]. Kompletní genom je složen z 2 167 264 párů bází s četností nukleotidů GC 41,7 %. Obsahuje 1 984 sekvencí kódujících protein.

3.2 Analýza genomu kmene CO4A

V dalším kroku byla provedena analýza genomu kmene *S. zooepidemicus* CO4A. Detekováno bylo 1453 variant, nicméně pro analýzu byly směrodatné především varianty s frekvencí 90 % a vyšší. Varianty s nižší frekvencí mohly vzniknout např. při přípravě sekvenační knihovny, v průběhu sekvenace, nebo při kombinaci obou dějů [51]. Po odfiltrování variant s frekvencí nižší než 90 % jsme

identifikovali 83 variant, z toho bylo 59 případů SNV dále 15 případů inserce a 9 případů delece. V tabulce 2 jsou uvedeny vybrané geny, ve kterých byla identifikována změna nukleotidové sekvence.

Identifikované varianty v jednotlivých nukleotidech u SNV, mohly způsobit změnu v aminokyselinovém řetězci. Případné změny AMK sekvence byly zaneseny do tab. 3 a dále diskutovány. Při bližším pohledu na referenční sekvenci genomu ATCC35246 zjistíme, že byl letos (2020) nově anotován [52], ale zůstala původní sekvenační data získaná na platformě Roche 454 genome sequencer FLX systému v roce 2011 [50]. Pyrosekvenace na platformě Roche byla v průběhu let optimalizována, nicméně má své limity použití (správnost čtení, délka readů aj.) [53] a společnost Roche v roce 2016 ukončila své aktivity v tomto odvětví. Je tedy nutné se ptát, zda byly všechny detekované SNV mutace a indely zapříčiněny působením UV záření. Genom CO4A byl osekvenován na platformě Illumina a později byla sekvenace ověřena ještě na platformě PacBio. V současnosti je to zřejmě nejspolehlivější kombinace sekvenačních technik k sekvenaci bakteriálního genomu [54]. Máme důvod se domnívat, že se v původním genomu ATCC35246 mohly vyskytnout změny způsobené chybnou sekvenací, popř. nedostatečnou délkou pokrytí genomu z důvodu menšího množství sekvenačních dat. Tím mohlo dojít i k chybné interpretaci některých změn AMK sekvencí. Zvláště pak u genů, které se zdály být u kmene ATCC35246 podle sekvence zcela nefunkční (například nesmyslná přítomnost velkého množství stop kodónů v sekvenci) a domnělou náhodnou mutací byly v genomu kmene CO4A opraveny. Možnost chybné sekvenace referenčního genomu ATCC35246 nelze vyloučit a proto je na ni dále v textu upozorňováno a je také u genů s variantami diskutována.

Tabulka 2: V tabulce jsou uvedeny vybrané SNV a indel mutace, které byly identifikovány v genomu kmene CO4A a jsou následně diskutovány. Dále je uveden význam genu a jeho označení (dle databáze NCBI [48]) a jakým způsobem ovlivní změna nukleotidu aminokyselinovou sekvenci proteinu. Všechny uvedené změny byly identifikovány v kódujících oblastech genu. CDS – CoDing Sequence / kódující sekvence

Region ATCC 35246	Typ varianty	Báze v ATCC 35246	Báze v CO4A	AMK v ATCC 35246	AMK v CO4A	Délka proteinu	Shoda	Frekvence [%]	Gen	Oblast	Funkce genu
2028892	Insertion	-	T	Lys (AA-G)	Asn (AAT)	479	497	96,4	Sesec_02448	CDS	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein
222567	Insertion	-	T	Lys (AA-G)	Asn (AAT)	515	532	96,8	Sesec_00251	CDS	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein
225027	SNV	C	T	Ala (GCT)	Thr (ACT)	401	405	99,0	Sesec_00255	CDS	galU; UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase HasC.2 [KO:K00963] [EC:2.7.7.9]
210788	SNV	C	T	Asn (AAC)	Asn (AAT)	427	428	99,8	Sesec_00234	CDS	GlmU, bifunctional UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase/glucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase
1129125	SNV	C	T	Arg (CGA)	Gln (CAA)	416	416	100,0	Sesec_01341	CDS	murM, UDP-N-acetylmuramoylpentapeptide-lysine N(6)-alanyltransferase [EC:2.3.2.10], [K05363]
1751733	SNV	T	C	Ile (ATA)	Met (ATG)	506	507	99,8	Sesec_02125	CDS	mraY, phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase [EC:2.7.8.13], [K01000]
258129	Insertion	-	TA	Val (G-TA)	Val (GTA)	17	17	100,0	Sesec_00296	CDS	nanE, N-acylglucosamine-6-phosphate 2-epimerase [EC:5.1.3.9], [K01788]
408995	SNV	A	G	Ile (ATT)	Val (GTT)	518	519	99,8	Sesec_00473	CDS	dnaK, chaperone protein DnaK (heat shock protein 70) [K04043]

V tabulce 2 jsou uvedeny identifikované substituce (SNV) a indel mutace u vybraných genů. Některé mutace vedly ke změnám aminokyselinové sekvence vznikajícího proteinu a některé k tzv. tiché mutaci (beze změny v aminokyselinové sekvenci). Tiché mutace byly v posledních letech hojně studovány a byl vyvrácen názor, že takovéto mutace nemají vliv na míru exprese genu. Naopak bylo zjištěno, že mohou mít významný vliv na míru exprese genu [55]. Změny v nukleotidové sekvenci mohou mít vliv na tvorbu sekundárních struktur mRNA a tím významně snížit efektivitu exprese aniž by došlo ke změně v sekvenci aminokyselinového řetězce [55]. V diskusi musí být zohledněna i možnost chybovosti v sekvenci referenčního genomu ATCC35246. Jak bylo dříve zmíněno, sekvence genomu kmene ATCC35246 [50] byla získána ne zcela spolehlivou metodou (pyrosekvenace) a mohly se v ní vyskytnout chyby.

Nejvíce nás zajímaly geny, ve kterých došlo k mutaci a byly spojené s produkcí kyseliny hyaluronové, nebo s blízkými metabolickými drahami. U genů přímo zapojených v produkci HA byly identifikovány dvě mutace. Gen Sesec_00234 (*glmU*) obsahoval tzv. tichou mutaci, při které nedochází ke změně v AMK sekvenci (Asn→Asn). Naopak změna proteinové sekvence (Ala→Thr) nastala u druhé kopie genu UTP-glukóza-1-fosfát-uridylyltransferázy kódované Sesec_00255 (*galU*). Geny Sesec_00255 (*galU*) a Sesec_01989 (*glmU*) jsou v genomu homologními sekvencemi genů Sesec_00234 (*glmU*) a Sesec_00233 (*galU*). Slouží ke stabilizaci produkce HA tím, že zajišťují dostatečné množství klíčových enzymů pro energetický metabolismus buněk [30].

Ve skupině identifikovaných insercí se také vyskytly geny, které je vhodné zmínit v souvislosti s produkcí HA. Jedním zásadním genem je *Sesec_00296 (nanE)*, který je klíčovým genem v drahách energetického metabolismu buňky. U CO4A došlo u *nanE* vlivem inserce TA v sekvenci kódující predikovanou N-acetylmannosamine-6-fosfát-2-epimerázu k posunu čtecího rámce, čímž mohla být ovlivněna funkce tohoto enzymu, který je klíčový také pro biosyntézu neuraminové kyseliny u bakterií [56, 57, 58]. Neuraminová kyselina se vyskytuje na povrchu buněk, přispívá k jejich adhezi a je zapojena i do signálních mechanismů [57]. Patogenní bakterie ji produkují jako virulentní faktor a má podobnou funkci v buňce jako HA (ochrana před imunitním systémem hostitelského organismu) [57].

Zajímavými geny jsou *Sesec_00251* a *Sesec_02448*. Kódují ve své sekvenci doménu LPXTG, jejíž funkce je blíže popsána jako protein-uchycující se k buněčné stěně. Uvedená doména se objevuje nejčastěji na C-terminálním konci proteinu a váže se kovalentní vazbou k pentaglycinovému vazebnému místu peptidoglykanu přes threonin vazebné místo domény LPXTG [59]. Je jedním ze základních virulentních faktorů u streptokoků, stejně jako kyselina hyaluronová. Jeho přítomnost na povrchu buněk může mít vliv na translokaci HA ven z buněk a tvorbu HA kapsule.

SNV mutace byla identifikována i v genu *Sesec_00473 (Ile→Val)*, který kóduje chaperon DnaK. DnaK chaperon systém byl charakterizován u několika patogenních bakteriích a existuje hypotéza, že je zapojen v důležitých buněčných reakcích i u streptokoků. Změna v tomto genu by mohla mít vliv na patogenicitu a stresovou rezistenci buněk [60].

Dva zbývající geny *Sesec_01341 (murM)* a *Sesec_02125 (mraY)* jsou důležitými geny v metabolických drahách syntézy peptidoglykanu. Syntéza peptidoglykanu je silně kompetující dráha k dráze syntézy HA. Zpracovává stejný prekurzor (UDP-GlcNAc) jako hlavní stavební jednotku. Při analýze na DNA čípech byla také zjištěna zvýšená míra exprese u obou genů (*murM* o 20 % a *mraY* o 30 %). *murM* kóduje enzym, který zpracovává meziprodukt dráhy ve prospěch streptokokálního typu peptidoglykanu. *mraY* kóduje enzym, který se podílí na utilizaci undecaprenolu a přivádí jeho metabolity do drah syntézy peptidoglykanu.

Tabulka 3: Inserce stejně jako delece způsobuje posun čtecího rámce, tudíž mohou způsobit změnu v kompletní části sekvence proteinu. V tabulce jsou uvedeny původní AMK sekvence dle referenčního genomu ATCC35246 a změněné sekvence AMK u CO4A. Červeně podbarvená aminokyselina je methionin, která je kódována start kodónem. Žlutě podbarvené části znázorňují sekvenci, která byla mutací změněna.

Gen	Region	Varianta	báze v ATCC	báze v CO4A	směr transkripce	původní AMK sekvence ATCC35246	změněná AMK sekvence CO4A
Sesec_02448	2028893	Insertion	-	T	5'←3'	MTNKTkRTGLVRKYGACSAAlALAALASLGAGKAVKA DQPAALKYPEPRDYFLHTREGDVIYDEDIKRYFEDLEAYLTA RLGGIDKKVEEAQKPGIPGPMGLAGPQGPKGDKGDPGAPG ERGPAGPKGDTGEAGPRGEQGPAGQAGERGPKGDTGAPGP KGEKGDGTGAVGPKGEKGDGTGATGPKGDKGERGEKGEQGG RGEKGEQQRGEKGEQQRGEKGEQQRGEKGEQQRGEKGEQQRGE KGEQKPKGDQKDKPSAPKAPEKAPAPKAPKASEQSSNPK APAPKSAPNKSAAPTGQKATLTPATGETNHPFFTLAALSVIAS AGVLTlKGKKTklLVIVSFPYDTNFNS*	MTNKTkRTGLVRKYGACSAAlALAALASLGAGKAVKADQP AALKYPEPRDYFLHTREGDVIYDEDIKRYFEDLEAYLTARLGGI DKKVEEAQKPGIPGPMGLAGPQGPKGDKGDPGAPGERGPAGP KGDGTGEAGPRGEQGPAGQAGERGPKGDTGAPGPKGEKGDGTGA VGPKGEKGDGTGATGPKGDKGERGEKGEQQRGEKGEQQRGE KGEQQRGEKGEQQRGEKGEQQRGEKGEQKPKGDQGGKDT KPSAPKAPEKAPAPKAPKASEQSSNPKAPAPKSAPNKSAAPTGQ KATLTPATGETNHPFFTLAALSVIASAGVLTlKGKID*ASYCIPV* H*F*QL
Sesec_00251	222568	Insertion	-	T	5'←3'	MRyTLNKNKRARNYGLCSAAAlAAVASLGTAGSAKA EEAKTLDQLPNPEEQILYNYWDTNDQKAREYLGdLYGFLKS YLGELEKklksldldlkvkkekkkkvrvskalrgkrvt kalrgkrvtkakvkkratkakkarvtkakkarakanavS kvkvkvrvtkvskakasmdirvtmekmlshqhlkqilnqq qklwrqqLkrahYQLQGRQITHSSPLQLVLSLAPAC*H*K ARKT	MRyTLNKNKRARNYGLCSAAAlAAVASLGTAGSAKAEEA KTLDQLPNPEEQILYNYWDTNDQKAREYLGdLYGFLKSYLGEL EKKAKEPGPAGPKGEKGEKGEKGDPIQGPKGEKGDQGPKEK GDQGGKGEKGDQSQKGEKGDQGGKGEKGQRGEQGGKGEKGD QGIQGGEGHGHKGHHGKDAKPSAPKADSKSTAKAMAPAAQKG TLPATGETNHPFFTLAALGVIASAGMLTLKGKKN*
Sesec_00296	258129	Insertion	-	TA	5'→3'	MPeKPSKAELLSVLKDGLIVSCQALPGEPLYSEAGGIMPL MAKAAEEAGAVGIRANGVRDIKEIQAVTDLPiIGIikKEYPPQ SPFITPTMAEVDALVALDVAVIALDCTQRRERHDGLAIADfir AIKEKYPDQLFMADISTLEEGLAAyEAGIDFVGTTLSGYTPY SRQGTGPDmELIGALCEAGVSvIAEGKIHSPEEARAVQALGV AGIVVGGAITRPKEIAERFVAALTSLSIKKY*	MPeKPSKAELLSVLKDGLIVSCQALPGEPLYSEAGGIMPLMA KAAEEAGAVGIRANGVRDIKEIQAVTDLPiIGIikKEYPPQSPFITP TMAEVDALVALDVAVIALDCTQRRERHDGLAIADfirAIKEKYPD QLFMADISTLEEGLAAyEAGIDFVGTTLSGYTPYSRQGTGPDME LIGALCEAGVYQ**LRARFTVQRRLGLFRLWEWLVLWLVLLP DQRKLQsALWRL*HRHCL*KNI

Když se podíváme na změnu u genu *nanE* (Sesec_00296), kterou mutace vyvolala v sekvenci aminokyselinového řetězce proteinu, zjistíme, že koncová část proteinu zřejmě nebude zcela funkční. Vznik mnoha nových stopkodónových sekvencí pravděpodobně zastaví translaci předčasně. Musíme ovšem vzít v úvahu i možnost chybné sekvence v genomu kmene ATCC35246. Analýzou pomocí metody DNA čipů a qPCR bylo zjištěno signifikantní navýšení (nejvyšší jaké bylo v práci zaznamenáno) míry exprese u tohoto genu v porovnání s genem referenčního kmene ATCC35246. Gen *nanE* má v genomu homologní sekvenci (Sesec_00291). U genu Sesec_00251 se zdá, že došlo ke stabilizaci sekvence proteinu a pravděpodobně i k aktivaci jeho funkce. Zde se však pravděpodobně jedná o chybu při sekvenaci referenčního genomu ATCC35246. Pravděpodobnost mutace s takovým důsledkem na sekvenci proteinu je velmi nízká. U genu Sesec_02448 byla sekvence díky mutaci zkrácena (zařazení stopkodónu) o několik aminokyselin.

3.3 Sledování exprese genů za pomoci DNA čipů

Syntéza kyseliny hyaluronové může být ovlivněna intenzitou exprese genů u různých metabolických drah, které spolu kompetují (biosyntéza peptidoglykanu, metabolismus aminocukrů a nukleotidů aj.) nebo se doplňují (metabolismus zpracování sacharózy aj.). Sledování celogenomové exprese metodou DNA čipů u bakteriálních kmenů *S. equi* subsp. *zooepidemicus* (interní kmen s označením CO4A a kmen referenční ATCC35246) bylo provedeno za daných kultivačních podmínek. Vyizolovaná RNA byla reverzní transkripcí přepsána do cDNA, která byla následně označena a hybridizována na čipu. Data byla zpracována za použití vhodně zvoleného softwaru. Analýza byla zaměřena na srovnání míry exprese u kmene referenčního ATCC35246 a kmene produkčního CO4A v souvislosti se zařazením k určité metabolické skupině. Pokud byl rozdíl exprese mezi kmeny nižší než 10 %, byla exprese považována za signifikantně neměnnou.

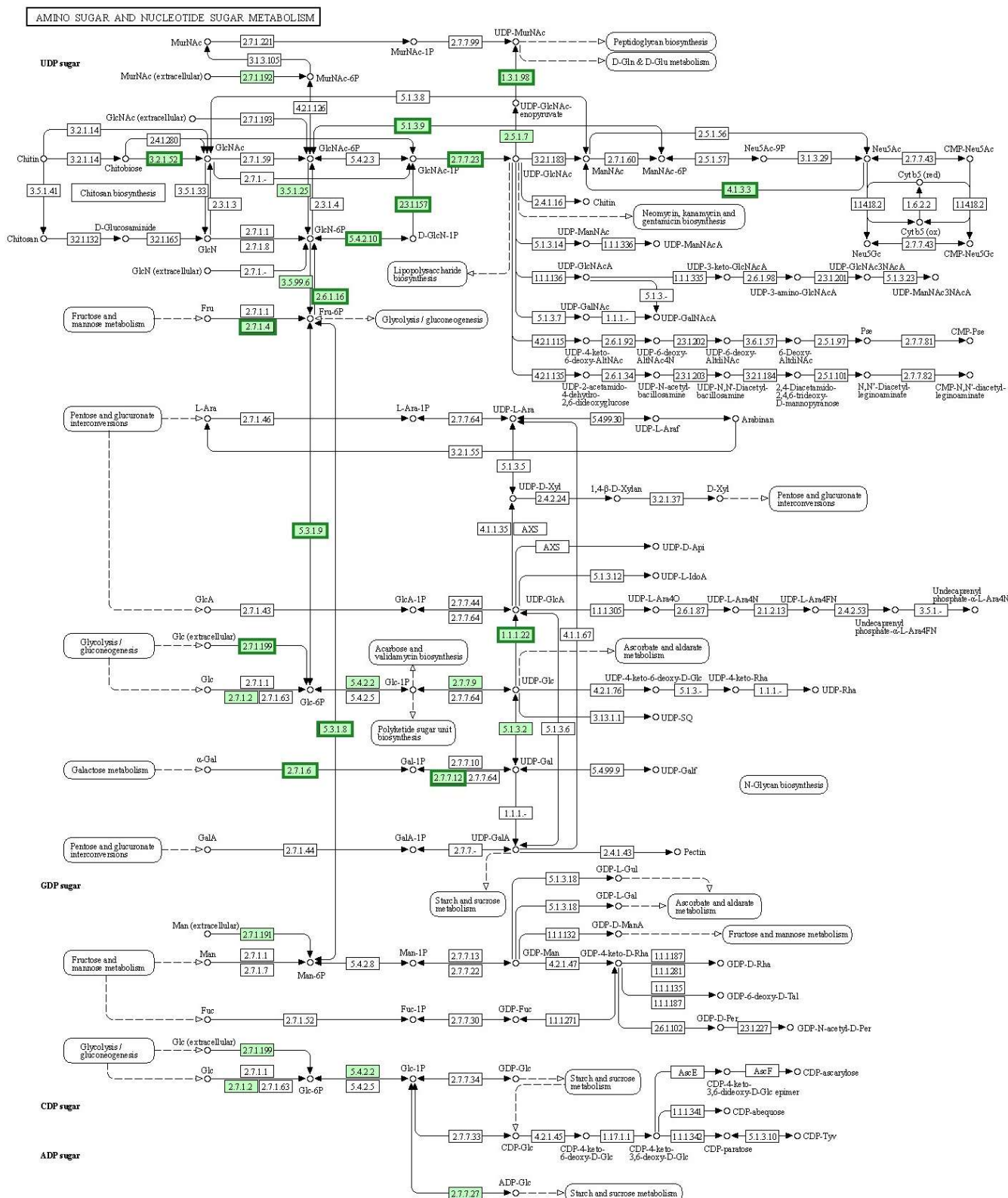
3.3.1 Metabolické dráhy aminocukrů a nukleotidů

Velkou skupinou sledovaných genů energetického metabolismu jsou ty, zapojené do drah zpracování aminocukrů a nukleotidů (tab. 4).

Tabulka 4: V tabulce jsou uvedeny geny kmene CO4A vztahující se k drahám aminocukrů a nukleotidů. Uvedeno je označení genu, jeho funkce, zkratka a číselné označení k vyhledávání v databázi KEGG [61]. Jsou zde uvedeny poměry exprese genů u obou kmenů normalizovány k referenčnímu genu *gyrA*. Na obrázku 8 jsou geny vykresleny v kontextu dalších drah. ¹⁾ Poměr celkové exprese genu v ATCC35246 k celkové expresi *gyrA* (ATCC35246). ²⁾ Poměr celkové exprese genu v CO4A k celkové expresi *gyrA* (CO4A). ³⁾ Poměr celkových exprese obou kmenů normalizovaných ke *gyrA*: CEG_{gyrA} (CO4A)/CEG_{gyrA} (ATCC)

	Gen	CEG _{gyrA} (ATCC) ¹⁾	CEG _{gyrA} (CO4A) ²⁾	Poměr ³⁾	Změna exprese	Funkce genu
AMINO A NUKLESACHARIDY	Sesec_00232	1,20	1,35	1,13	↑13%	ugd; UDP-glucose 6-dehydrogenase HasB [KO:K00012] [EC:1.1.1.22]
	Sesec_00233	2,35	3,14	1,33	↑33%	galU; UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase HasC.2 [KO:K00963] [EC:2.7.7.9]
	Sesec_00234	1,35	1,73	1,28	↑28%	glmU; Bifunctional protein glmU [KO:K04042] [EC:2.7.7.23 2.3.1.157]
	Sesec_00235	1,83	2,21	1,21	↑21%	gpi; glucose-6-phosphate isomerase [KO:K01810] [EC:5.3.1.9]
	Sesec_00255	2,55	2,66	1,04	↑4%	galU; UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase HasC.2 [KO:K00963] [EC:2.7.7.9]
	Sesec_00291	1,69	2,40	1,42	↑42%	nanE; N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase [KO:K01788] [EC:5.1.3.9]
	Sesec_00292	0,96	1,12	1,17	↑17%	ptsG; sugar phosphotransferase system (PTS), IIBC component [KO:K02778 K02779] [EC:2.7.1.199]
	Sesec_00293	0,86	0,97	1,13	↑13%	PTS system, maltose and glucose-specific IIA-B-C component [KO:K02777] [EC:2.7.1.-]
	Sesec_00296	3,25	5,98	1,84	↑84%	nanE; N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase [KO:K01788] [EC:5.1.3.9]
	Sesec_00302	0,87	1,09	1,25	↑25%	dapA; N-acetylneuraminate lyase [KO:K01639] [EC:4.1.3.3]
	Sesec_00430	1,54	2,05	1,33	↑33%	scrK; fructokinase ScrK [KO:K00847] [EC:2.7.1.4]

Sesec_00431	1,06	1,30	1,23	↑23%	manA; mannose-6-phosphate isomerase Pmi [KO:K01809] [EC:5.3.1.8]
Sesec_00494	1,73	1,83	1,06	↑6%	manZ; mannose-Specific Phosphotransferase System Component IID ManZ [KO:K02796] [EC:2.7.1.191]
Sesec_00495	1,67	1,75	1,05	↑5%	manY; mannose-specific phosphotransferase system (PTS), IIC component [KO:K02795] [EC:2.7.1.191]
Sesec_00497	0,84	0,93	1,11	↑11%	manX; PTS system mannose-specific EIIB component ManX [KO:K02793 K02794] [EC:2.7.1.191 2.7.1.191]
Sesec_00575	1,18	1,22	1,03	↑3%	nagA; N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase [KO:K01443] [EC:3.5.1.25]
Sesec_00709	1,82	1,83	1,00	0%	glk; glucokinase [KO:K00845] [EC:2.7.1.2]
Sesec_00795	0,88	0,96	1,09	↑9%	nagB; glucosamine-6-phosphate isomerase [KO:K02564] [EC:3.5.99.6]
Sesec_00830	0,97	1,17	1,21	↑21%	murA; UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase [KO:K00790] [EC:2.5.1.7]
Sesec_00848	0,77	0,89	1,16	↑16%	nagZ; glycosyl hydrolase family protein [KO:K01207] [EC:3.2.1.52]
Sesec_01008	1,15	1,48	1,29	↑29%	PTS system mannose/fructose permease IIC component [KO:K02795] [EC:2.7.1.191]
Sesec_01009	1,24	1,64	1,32	↑32%	sugar phosphotransferase system (PTS), mannose/fructose/sorbose family, IID component [KO:K02796] [EC:2.7.1.191]
Sesec_01011	0,65	0,75	1,14	↑14%	sugar phosphotransferase system (PTS), fructose family, IIA component [KO:K02793] [EC:2.7.1.191]
Sesec_01059	1,16	1,24	1,07	↑7%	glgC; glucose-1-phosphate adenylyltransferase [KO:K00975] [EC:2.7.7.27]
Sesec_01060	0,86	1,09	1,27	↑27%	glgC; glycogen biosynthesis protein GlgD [KO:K00975] [EC:2.7.7.27]
Sesec_01072	1,02	0,99	0,97	↓3%	murA; UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase [KO:K00790] [EC:2.5.1.7]
Sesec_01134	1,27	1,36	1,07	↑7%	galE; UDP-glucose 4-epimerase [KO:K01784] [EC:5.1.3.2]
Sesec_01170	1,73	2,37	1,37	↑37%	glmS; glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [KO:K00820] [EC:2.6.1.16]
Sesec_01237	1,19	1,22	1,02	↑2%	manB; phosphomannomutase PgmA [KO:K01835] [EC:5.4.2.2]
Sesec_01392	1,21	1,39	1,15	↑15%	murB; UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase [KO:K00075] [EC:1.3.1.98]
Sesec_01545	1,40	1,51	1,08	↑8%	sugar phosphotransferase system (PTS), mannose/fructose family, IID component [KO:K02796] [EC:2.7.1.191]
Sesec_01547	1,14	1,19	1,05	↑5%	agaC; mannose permease IIC component ManY [KO:K02795] [EC:2.7.1.191]
Sesec_01549	0,58	0,62	1,07	↑7%	PTS system mannose/fructose family IIA component [KO:K02793] [EC:2.7.1.191]
Sesec_01569	2,31	2,77	1,20	↑20%	glmM; phosphoglucosamine mutase GlmM [KO:K03431] [EC:5.4.2.10]
Sesec_01989	2,15	2,79	1,30	↑30%	glmU; Bifunctional protein glmU [KO:K04042] [EC:2.7.7.23 2.3.1.157]
Sesec_02348	0,95	1,19	1,25	↑25%	galK; galactokinase [KO:K00849] [EC:2.7.1.6]
Sesec_02349	0,68	0,77	1,13	↑13%	galT; galactose-1-phosphate uridylyltransferase [KO:K00965] [EC:2.7.7.12]
Sesec_02350	0,57	0,69	1,21	↑21%	galE; UDP-glucose 4-epimerase [KO:K01784] [EC:5.1.3.2]
Sesec_02421	1,57	1,96	1,25	↑25%	gamP; glucose-specific phosphotransferase system (PTS), IIABC component [KO:K02777 K20107 K20108] [EC:2.7.1.- 2.7.1.208]



Obrázek 8: Označené geny (zelené orámování) se podílejí především na metabolických drahách N-acetylglukosaminu. Další geny kódují enzymy zapojené v metabolických drahách sacharidických sloučenin navazující na glykolýzu a glukoneogenezi. Obecně jsou aminocukry, nukleotidy a jejich metabolické verze nejvíce zapojeny v drahách glykolýzy a glukoneogeneze. Zeleně podbarvené geny se vyskytují u *S. zooepidemicus* ATCC35246. Bíle podbarvené geny nejsou u *S. zooepidemicus* přítomny. [upraveno dle 61]

Výběr sledovaných genů metabolických drah aminocukrů a nukleotidů je zaměřen na metabolismus UDP cukrů (*N*-acetylglukosaminu, GlcNAc) jako prekursoru biosyntézy kyseliny hyaluronové. *N*-acetylglukosamin může být získáván extracelulárně anebo může být produktem metabolismu. Gen Sesec_00848 (*nagZ*, EC:3.2.1.52) kóduje β -*N*-acetylhexosaminidázu, která katalyzuje hydrolýzu β -*N*-acetylglukosaminu (NAG) z neredukujícího konce různých glukokonjugátů a přivádí GlcNAc do metabolismu [62]. U tohoto genu bylo sledováno navýšení exprese o 16 %. Gen Sesec_00430 kóduje enzym fruktokinázu (*scrK*, EC:2.7.1.4), který mění fruktózu na fruktózu-6-P. Fruktóza přichází z drah metabolismu fruktózy, manózy a zejména sacharózy. Fruktóza-6-P může dále odcházet ke zpracování do kaskád glykolýzy a syntézy HA. Zde bylo pozorováno navýšení míry exprese o 33 % v porovnání s referenčním kmenem. Fruktóza-6-P může být jako meziprodukt konvertována na glukózu-6-P. Konverzi katalyzuje enzym glukóza-6-fosfát izomeráza (*gpi*, EC:5.3.1.9), která je kódována genem Sesec_00235. Navýšení jeho relativní míry exprese v porovnání s kmenem ATCC35246 bylo stanoveno na 21 %. Gen je součástí jak drah glykolýzy, tak biosyntézy HA. Fruktóza-6-P může být odvedena jako substrát i do drah metabolismu manózy. Změnu na manózu-6-P katalyzuje enzym manóza-6-fosfát izomeráza, která je kódována genem Sesec_00431 (*manA*, EC:5.3.1.8). Navýšení míry exprese bylo o 23 % vyšší než u referenčního kmene. Glukózu-6-P může buňka získat hydrolýzou sacharózy, nebo jako extracelulární substrát a k tomu je využíván gen Sesec_00292 kódující část fosfotransferázového systému PTS (*ptsG*, EC:2.7.1.199). U tohoto genu bylo sledováno navýšení exprese o 17 %.

V metabolismus aminocukrů a nukleotidů je zajímavý gen *nanE* (Sesec_00296), který katalyzuje obousměrnou reakci měnící GlcNAc-6-P na ManNAc-6-P a může tak odvádět prekursor syntézy HA do drah metabolismu manózy. Gen Sesec_00296 (*nanE*) má v genomu homologní sekvenci Sesec_00291. Obě kopie vykazovaly vysokou míru exprese v porovnání s referenčním kmenem ATCC35246 (Sesec_00291 měl nárůst exprese o 42 % a Sesec_00296 dokonce o 84 %). V sekvenci Sesec_00296 byla identifikována inserce (kap. 3.2 tab. 2), která posunula a především zkrátila čtecí rámec. Důsledkem mohl být pozorovaný nárůst exprese genů. Gen *nanE* je klíčovým enzymem také u biosyntézy *N*-acetylneuraminové kyseliny (sialové kyseliny) [56, 57, 58]. Geny Sesec_00291 (*nanE*), Sesec_00292 (*ptsG*), Sesec_00293 (PTS systém), Sesec_00296 (*nanE*) a Sesec_00302 (*dapA*) jsou zřejmě součástí operonu metabolické dráhy biosyntézy kyseliny neuraminové, kde se jako iniciační molekula uplatňuje *N*-acetylglukosamin [57]. Z dat je patrné, že se zvýšila jejich exprese oproti ATCC35246 v rozmezí 13-84 %. Může to naznačovat právě nedostatek enzymu *N*-acetylmannosamin-6-fosfát-2-epimerázy (popř. omezení jeho funkčnosti v porovnání s ATCC35246), potažmo depresi této metabolické dráhy, která spotřebovává u *S. zooepidemicus* CO4A prekursor syntézy HA – GlcNAc. Pokud tedy jedna z cest zpracování GlcNAc není funkční, může to vést k posílení zbylých drah a to by mohlo vysvětlovat i zvýšenou expresi genů, které tento cukr zpracovávají.

Pokud se podíváme na geny více zapojené do metabolických drah UDP-GlcNAc, můžeme začít u velmi běžného metabolitu fruktózy-6-P. Fruktóza-6-P přichází z cyklu glykolýzy a glukoneogeneze. Pomocí enzymu glukózamino-fruktóza-6-fosfát aminotransferáza (*glmS*, EC:2.6.1.16), který je kódován genem Sesec_01170, je konvertována na glukózamin-6-P. Míra exprese byla o 37 % vyšší než u kmene ATCC35246. Kaskáda pokračuje genem Sesec_01569, který kóduje enzym fosfoglukózamino mutázu (*glmM*, EC:5.4.2.10). Mění glukózamin-6-P na D-glukózamin-1-P. Míra exprese byla stanovena na hodnotu o 20 % vyšší. D-glukózamin-1-P je následně konvertován na *N*-acetylglukózamin-1-P za katalýzy C-terminální domény bifunkčního enzymu glukosamin-1-fosfát acetyltransferázy (*glmU*, EC:2.3.1.157; EC:2.7.7.23), který je kódován genem Sesec_01989 (Sesec_00234). Míra jeho exprese byla navýšena o 30 % v porovnání

s referenčním kmenem. Tento enzym (*glmU*) spolu s předchozími dvěma enzymy (*glmS*, *glmM*) se přímo podílejí na syntéze prekursoru pro produkci HA. N-terminální doména stejného enzymu (*glmU*) katalyzuje změnu *N*-acetylglukosaminu-1-P na aktivovanou formu UDP-*N*-acetylglukosamin [63]. Zde bylo zaznamenáno navýšení míry exprese o 28 %.

Geny zapojené přímo v metabolických reakcích vedoucích ke vzniku *N*-acetylglukosaminu měly vyšší změnu míry exprese, než v drahách okrajových, nebo tam kde byl metabolit odváděn do jiných cyklů. Můžeme říci, že u kmene CO4A měly klíčové geny signifikantně vyšší změnu exprese a tudíž je pravděpodobné, že se projevila i na úrovni proteomu. Můžeme pozorovat kaskádu genů s vyšší mírou exprese směřující od glukózy-6-P a fruktózy (pocházející ze sacharózy, jako uhlíkového zdroje v kultivaci) až k UDP-*N*-acetylglukosaminu (prekursoru biosyntézy HA). Zajímavým genem byl i gen *nanE*, který je klíčovým jak pro energetický metabolismus buňky, tak pro biosyntézu neuraminové kyseliny [56].

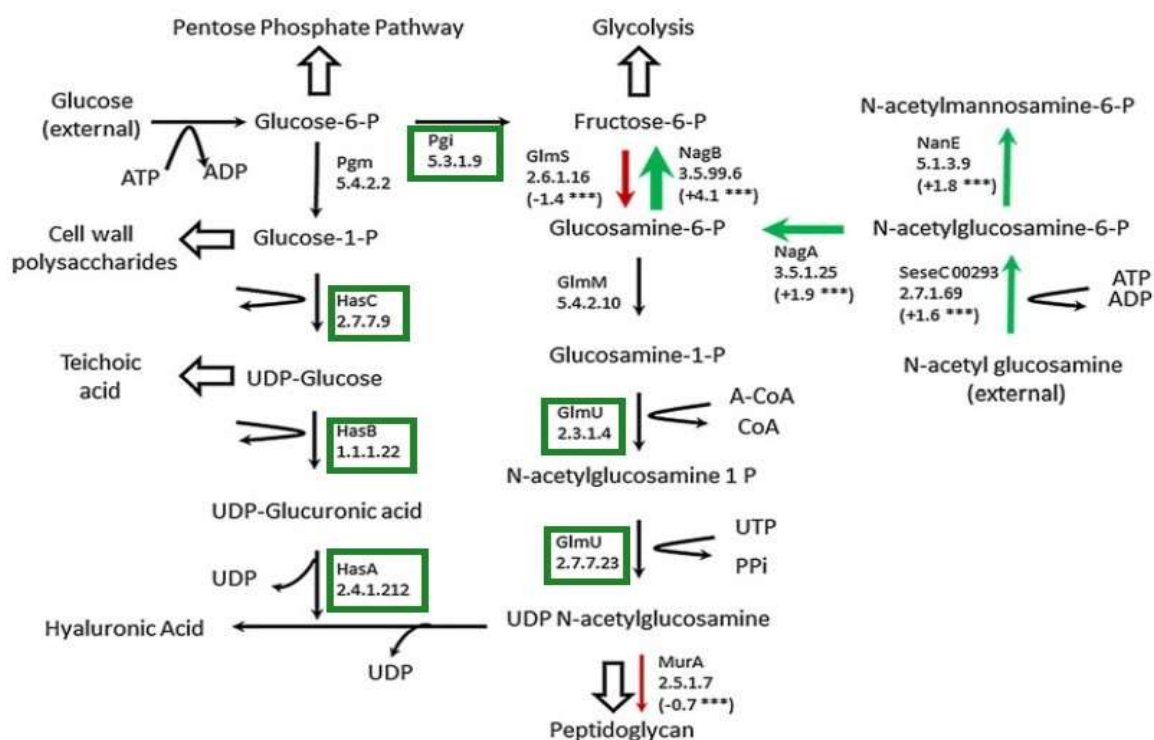
3.3.2 Geny *has* operonu a vybrané geny související s produkcí HA

Do tohoto oddílu byly zařazeny geny metabolických drah, které souvisí přímo, nebo nepřímo s produkcí HA, nebo ji mohou svou aktivitou ovlivňovat (tab. 6). Byly sem zařazeny geny *has* operonu (tab. 5), tedy přímo dráhy syntézy HA.

has operon

Tabulka 5: V tabulce jsou uvedeny geny zapojené v metabolických drahách produkce kyseliny hyaluronové (geny *has* operonu). Uvedeno je označení genu, jeho funkce, zkratka a číselné označení k vyhledávání v databázi KEGG [61]. Jsou zde uvedeny poměry exprese genů u obou kmenů normalizované k referenčnímu genu *gyrA*. Schéma genů *has* operonu v kontextu biosyntézy HA je uvedeno na obrázku 9. ¹⁾ Poměr celkové exprese genu v ATCC35246 k celkové expresi *gyrA* (ATCC35246). ²⁾ Poměr celkové exprese genu v CO4A k celkové expresi *gyrA* (CO4A). ³⁾ Poměr celkových exprese obou kmenů normalizovaných ke *gyrA*: $CEG_{gyrA} (CO4A) / CEG_{gyrA} (ATCC)$

	Gen	CEG_{gyrA} (ATCC) ¹⁾	CEG_{gyrA} (CO4A) ²⁾	Poměr ³⁾	Změna exprese	Funkce genu
HAS OPERON	Sesec_00231hasA	2,56	4,77	1,86	↑86%	hasA; hyaluronansynthase HasA [KO:K00752][EC:2.4.1.212]
	Sesec_00232ugd	1,20	1,35	1,13	↑13%	ugd; UDP-glucose 6-dehydrogenase HasB [KO:K00012] [EC:1.1.1.22]
	Sesec_00233galU	2,35	3,14	1,33	↑33%	galU; UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase HasC.2 [KO:K00963] [EC:2.7.7.9]
	Sesec_00234glmU	1,35	1,73	1,28	↑28%	glmU; Bifunctional protein glmU [KO:K04042] [EC:2.7.7.23 2.3.1.157]
	Sesec_00235gpi	1,83	2,21	1,21	↑21%	gpi; glucose-6-phosphate isomerase [KO:K01810] [EC:5.3.1.9]



Obrázek 9: Geny *has* operonu v kontextu metabolických drah produkce HA mající změnu exprese vyšší než 10 % [upraveno dle 5].

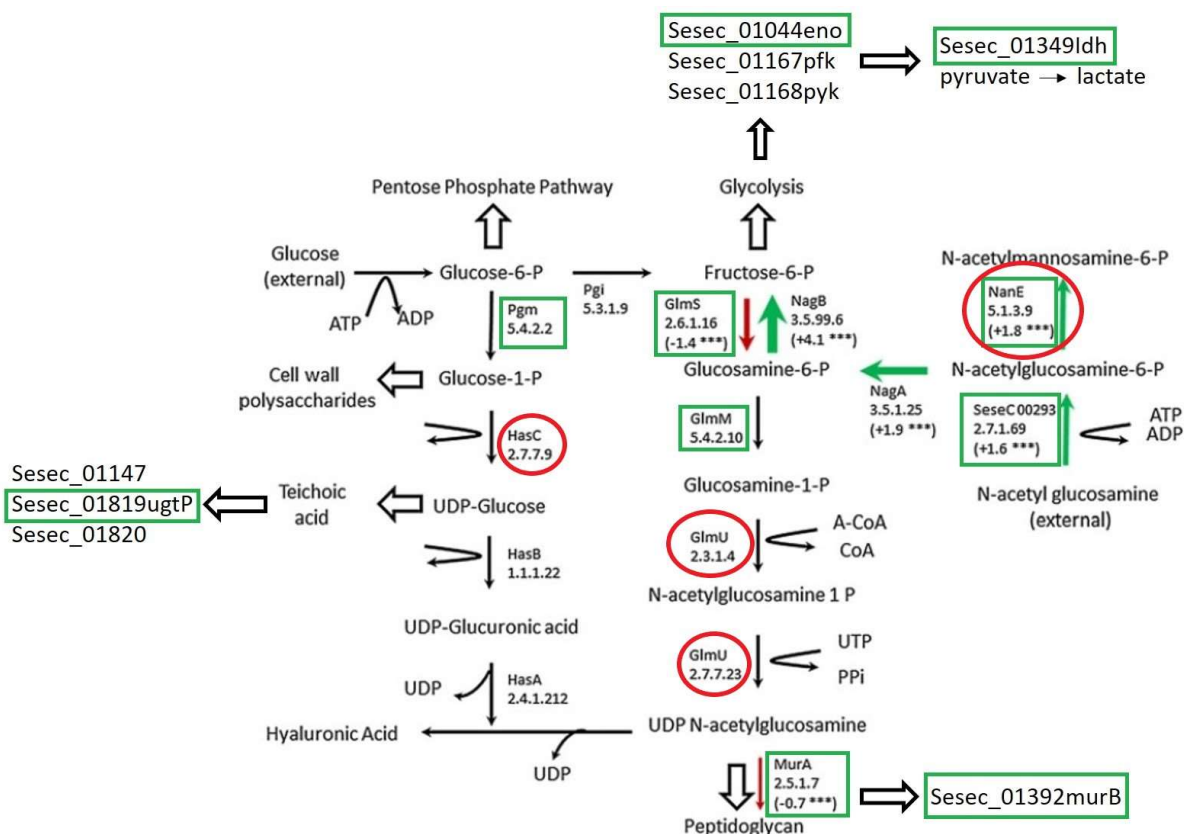
has operon, kóduje centrální enzymy biosyntézy kyseliny hyaluronové, a je regulován silným promotorem. Očekávali jsme, že vyšší výtěžek HA u kmene CO4A v porovnání s referencí by mohl mít původ ve zvýšené expresi genů *has* operonu. Naše výsledky skutečně ukázaly, že exprese *has* operonu u CO4A je vyšší než u ATCC35246. Nejvyšší změna genové exprese byla zaznamenána u genu *Sesec_00231* kódujícího hyaluronan syntázu (*hasA*, EC:2.4.1.212). Enzym je klíčový pro spojení dvou prekurzorů a vzniku HA. Navýšení bylo o 86 % v porovnání s referenčním kmenem. U ostatních genů nebylo zaznamenáno tak výrazné navýšení míry exprese (*Sesec_00232* o 13 %; *Sesec_00233* o 33 %; *Sesec_00234* o 28 %; *Sesec_00235* o 21 %). Síla exprese genů v jednom operonu klesá se vzdáleností od promotorové sekvence [30]. Zde se tento jev úplně nepotvrdil. Je však nutné zohlednit i to, že gen *gpi* je regulován samostatným promotorem (σ^{70}) [30]. Podílí se, jako jeden s klíčových genů, na drahách metabolismu cukrů, a proto je pro buňku nezbytná samostatná regulace jeho exprese.

U *Sesec_00234* (*glmU*) byla, jako u jediného genu *has* operonu, identifikována bodová mutace. Jde se o tzv. tichou mutaci, kdy nedochází ke změně v sekvenci aminokyselin vzniklého proteinu. Mutace nezpůsobila změnu aminokyselinové sekvence, nicméně stejný polypeptid s jinou nukleotidovou sekvencí by mohl být translatován s rozdílnou efektivitou [55].

Vybrané metabolické dráhy

Tabulka 6: V tabulce jsou uvedeny geny zapojené ve vybraných metabolických drahách souvisejících s produkcí HA. Uvedeno je označení genu, jeho funkce, zkratka a číselné označení k vyhledávání v databázi KEGG [61]. Jsou zde uvedeny poměry exprese genů u obou kmenů normalizované k referenčnímu genu *gyrA*. Geny jsou vykresleny v kontextu biosyntézy HA na obrázku 10. ¹⁾ Poměr celkové exprese genu v ATCC35246 k celkové expresi *gyrA* (ATCC35246). ²⁾ Poměr celkové exprese genu v CO4A k celkové expresi *gyrA* (CO4A). ³⁾ Poměr celkových exprese obou kmenů normalizovaných ke *gyrA*: $CEG_{gyrA} (CO4A) / CEG_{gyrA} (ATCC)$

	Gen	CEG_{gyrA} (ATCC) ¹⁾	CEG_{gyrA} (CO4A) ²⁾	Poměr ³⁾	Změna exprese	Funkce genu
VYBRANÉ METABOLICKÉ DRÁHY	Sesec_00293	0,86	0,97	1,13	↑13%	PTS system, maltose and glucose-specific IIA-B-C component [KO:K02777] [EC:2.7.1.-]
	Sesec_00296nanE	3,25	5,98	1,84	↑84%	nanE; N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase [KO:K01788] [EC:5.1.3.9]
	Sesec_00467pgm	1,73	1,91	1,10	↑10%	gpm; phosphoglycerate mutase family protein
	Sesec_00575nagA	1,18	1,22	1,03	↑3%	nagA; N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase [KO:K01443] [EC:3.5.1.25]
	Sesec_00795nagB	0,88	0,96	1,09	↑9%	nagB; glucosamine-6-phosphate isomerase [KO:K02564] [EC:3.5.99.6]
	Sesec_00830murA	0,97	1,17	1,21	↑21%	murA; UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase [KO:K00790] [EC:2.5.1.7]
	Sesec_01044eno	2,47	3,02	1,22	↑22%	eno; phosphopyruvate hydratase [KO:K01689] [EC:4.2.1.11]
	Sesec_01147	0,78	0,78	1,00	0%	sulfatase [KO:K19005] [EC:2.7.8.20]
	Sesec_01167pfk	1,72	1,62	0,94	↓6%	pfk; 6-phosphofructokinase [KO:K00850] [EC:2.7.1.11]
	Sesec_01168pyk	1,53	1,67	1,09	↑9%	pyk; pyruvate kinase [KO:K00873] [EC:2.7.1.40]
	Sesec_01170glmS	1,73	2,37	1,37	↑37%	glmS; glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [KO:K00820] [EC:2.6.1.16]
	Sesec_01349ldh	1,48	1,98	1,33	↑33%	ldh; L-lactate dehydrogenase [KO:K00016] [EC:1.1.1.27]
	Sesec_01392murB	1,21	1,39	1,15	↑15%	murB; UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase [KO:K00075] [EC:1.3.1.98]
	Sesec_01569glmM	2,31	2,77	1,20	↑20%	glmM; phosphoglucosamine mutase GlmM [KO:K03431] [EC:5.4.2.10]
	Sesec_01819ugtP	1,65	2,09	1,27	↑27%	ugtP; glycosyltransferase [KO:K19002] [EC:2.4.1.337]
	Sesec_01820	1,32	1,44	1,09	↑9%	glycosyltransferase [KO:K13677] [EC:2.4.1.208]



Obrázek 10: Geny vybraných metabolických drah zařazeny do souvislosti s biosyntézou HA. Zeleně označeny jsou geny, které měly změnu míry exprese vyšší než 10 % v porovnání s referenčním kmenem. Červeně zakroužkované jsou geny, u kterých byla zjištěna mutace. U genu *glmU* byla identifikována SNV tichá mutace, u genu *nanE* došlo k inserci dvou nukleotidů a u *HasC* (*galU*) se vyskytla SNV mutace v jeho homologií sekvenci *Sesec_00255* [upraveno dle 5].

Produkcí HA by mohlo ovlivnit odvádění meziproduktů syntézy ke zpracování do jiných metabolických drah. Příkladem toho může být využití aktivovaného UDP-*N*-acetylglukosaminu pro syntézu peptidoglykanu. Tímto směrem byly sledovány dva geny (*Sesec_00830*, *Sesec_01392*). Gen *Sesec_00830* (*murA*, EC:2.5.1.7) měl navýšenou míru exprese o 21 % v porovnání s kmenem ATCC35246. Gen *Sesec_01392* (*murB*, EC:1.3.1.92) měl expresi vyšší o 15 %. Aktivita *hasA* genu (86 % navýšení) byla v porovnání se zmíněnými geny tak vysoká, že pokud by se ve stejné míře projevila na proteinové úrovni, mohlo by dojít k navýšení HA syntáz v membráně a zřejmě by docházelo k významnému navýšení produkce HA. Dráha syntézy peptidoglykanu kompetuje s dráhou syntézy HA především při intenzivním růstu streptokokálních buněk. Později, kdy je dosaženo maximální hustoty buněk v médiu, se tato dráha realizuje v případných přestavbách buněčné stěny. Souvisí to i se skutečností, že nárůst koncentrace HA v médiu je oproti růstu buněk zpožděný.

Do metabolických drah syntézy lipoteichoové kyseliny by mohla být odváděna UDP-glukóza. Tímto směrem byl sledován gen *Sesec_01819* (*ugtP*, EC:2.4.1.337), který měl expresi vyšší o 27 % než u referenčního kmene. Lipoteichoová kyselina je ukotvena na plasmatické membráně buněk a napomáhá k jejich uchycení na sliznicích hostitelského organismu [151, 146]. Směrem z metabolismu syntézy HA byly sledovány dva geny (*Sesec_01044*, *Sesec_01349*). U genu *Sesec_01044* (*eno*, EC:4.2.1.11) bylo vypočteno navýšení exprese o 22 % v porovnání s referencí. U genu *Sesec_01349* (*ldh*, EC:1.1.1.27) bylo zjištěno navýšení o 33 %. Změna exprese genů směrem do drah glykolýzy byla vyšší než u drah syntézy peptidoglykanu. Buňka by pravděpodobně preferovala energetický metabolismus před navýšením syntézy komponent buněčné stěny. Samozřejmě bude záležet na stavu kultivace a jejích podmínkách. Fruktóza-6-P

je konvertována i na glukosamin-6-P, který vede k syntéze UDP-*N*-acetylglukosaminu. Konverze je katalyzována aminotransferázou, která je kódována genem *Sesec_01170* (*glmS*, EC:2.6.1.16). Jeho změna exprese byla o 37 % vyšší než u kmene ATCC35246. Pokud porovnáme dva směry, kterými může být fruktóza-6-P zpracována, intenzita exprese genů je porovnatelná.

Jedním z faktorů, které by mohly pozitivně ovlivnit produkci HA, je zpracování *N*-acetylglukosaminu, který byl dodán jako extracelulární substrát. Enzym ke konverzi GlcNAc na *N*-acetylglukosamin-6-P kóduje gen *Sesec_00293* (PTS transportní systém, EC:2.7.1.-). Jeho exprese byla o 13 % vyšší než u reference. Následně se mění glukosamin-6-P na glukosamin-1-P za katalýzy enzymem, který je kódován genem *Sesec_01569* (*glmM*, EC:5.4.2.10). Exprese genu byla o 20 % vyšší než u kmene ATCC35246. *N*-acetylglukosamin-6-P nemusí být směřován přímo do dráhy syntézy HA. Gen *Sesec_00296* (*nanE*, EC:5.1.3.9) odvádí *N*-acetylglukosamin-6-P konverzí na *N*-acetylmanosamin-6-P do drah metabolismu manózy (tj. také do drah biosyntézy kyseliny *N*-acetylneuraminové [56, 57, 58]). Exprese genu byla o 84 % vyšší než u kmene ATCC35246. Otázkou je, jaký vliv bude mít dodání externího GlcNAc do kultivačního prostředí při cíleném experimentu. Vliv GlcNAc na produkci HA byl studován pomocí metody qPCR.

Využití externě dodané sacharózy, která je štěpena na glukózu-6-P a fruktózu, může mít také potenciálně pozitivní vliv na produkci HA. Tento směr dráhy byl sledován prostřednictvím genu *Sesec_00467* (*gpm*, EC:5.4.2.2), který kóduje mutázu měnící glukózu-6-P na glukózu-1-P. Míra exprese genu byla o 10 % vyšší než u reference. Navíc glukóza-6-P může vstupovat do drah pentózového cyklu.

3.4 Sledování exprese vybraných genů pomocí metody qPCR

Metoda qPCR umožňuje sledování a analýzu míry exprese genů v reálném čase a je schopná detekovat velmi malé koncentrace analyzovaného substrátu. Klíčové pro hodnocení a interpretaci výsledků získaných touto metodou bylo stanovení referenčního genu. Následně byly analyzovány geny zapojené do metabolických drah syntézy HA a do metabolických drah potenciálně participujících na produkci HA. Byly srovnány standardní kultivace kmenů CO4A a ATCC35246 s kultivacemi suplementovanými GlcNAc, jedním z prekurzorů syntézy HA. Byl testován jeho vliv na expresi uvedených genů i na celkový výtěžek HA. U všech analýz byla jako negativní kontrola použita cDNA z bakteriálního kmene *Escherichia coli DH5α* společně s primery pro gen kódující hyaluronan syntázu (*hasA*). Gen *hasA* není v *E. coli* přítomen, hodnoty byly proto metodou qPCR nedetekovatelné, nebo zcela mimo standardní rozsah detekce.

3.4.1 Ověření exprese genů *has* operonu

Geny *has* operonu jsou odpovědné za produkci kyseliny hyaluronové. Kyselina hyaluronová jako jeden z virulentních faktorů je pro přežití streptokoka v hostitelském organismu velmi důležitá. Proto bylo zajímavé sledovat expresi těchto genů u kmene CO4A, který vykazuje vysokou míru produkce HA v porovnání se sbírkovým kmenem ATCC35246 [50]. Geny a navržené primery jsou uvedeny v tabulce 7.

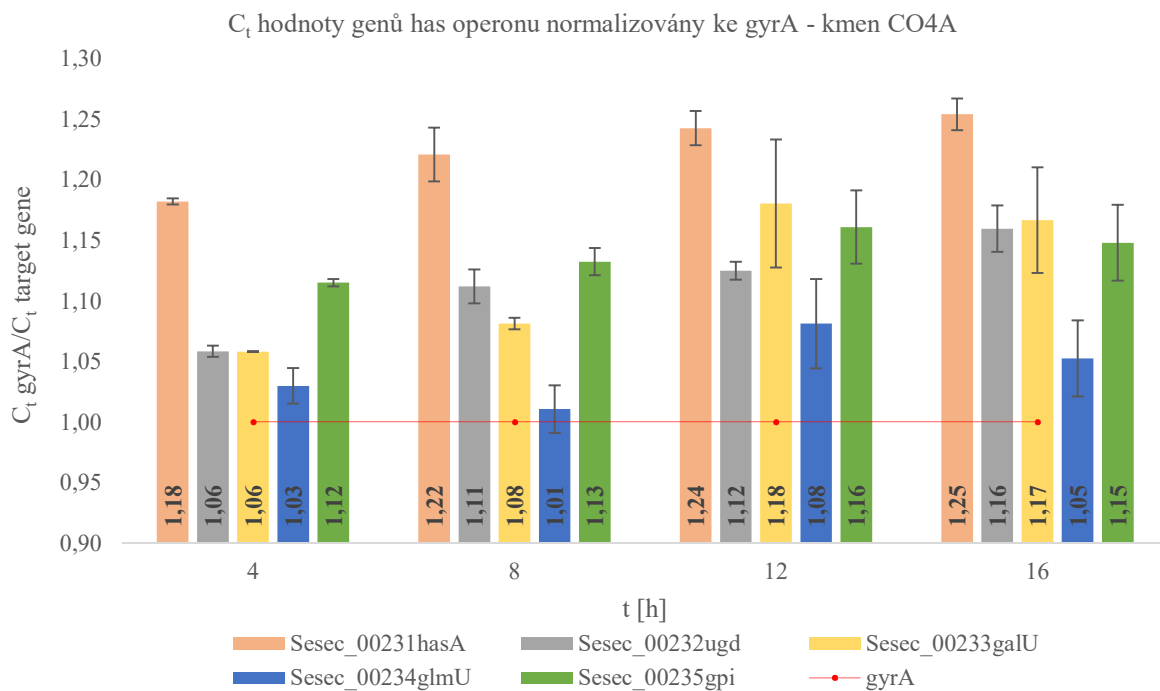
Tabulka 7: Geny *has* operonu s navrženými primery pro analýzu qPCR

Označení genu	Primery		Produkt genu (protein)
Sesec_00231	Forward	TTAAGCACCCGCTGTCCTTC	hasA, hyaluronan synthase HasA
	Reverse	TTACGTGTTCCCCAGTCAGC	
Sesec_00232	Forward	TTTATGGGCTCACAGGAGGC	ugd, UDP-glucose 6-dehydrogenase HasB
	Reverse	AGACACCCGCATAGCCAAAA	
Sesec_00233	Forward	CTCCAAGCCAAGGGCAAAAC	galU, UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (HasC)
	Reverse	AGTCCTCTAGGGTGGCTCTG	
Sesec_00234	Forward	GCCAGCCAAGAAAAGGTTGG	glmU, Bifunctional protein glmU
	Reverse	TTGTTGATCCGCTCCTGCAT	
Sesec_00235	Forward	TTTCTTGGGCTGGCTTGAGT	gpi, glucose-6-phosphate isomerase
	Reverse	AGCACCAAGGTAAGAGCCAC	

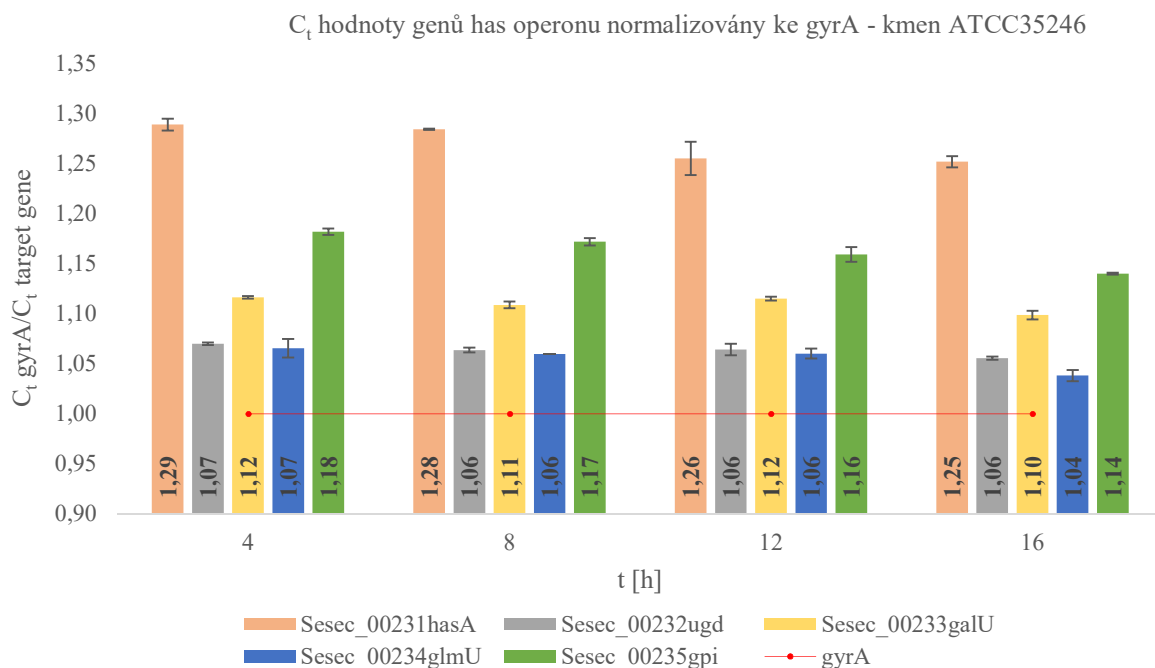
Míra exprese genů *has* operonu byla sledována metodou qPCR. Získané hodnoty C_i byly normalizovány k referenčnímu genu *gyrA* a byl vypočten průměr ze tří biologických replikátů experimentu. Data jsou uvedena v tabulce 8 a byla vynesena do grafů pro oba kmeny (graf 1 a 2). Geny jsou uvedeny v pořadí, v jakém jsou přítomny v *has* operonu. Směrem od promotoru míra exprese klesá. Výjimkou je gen *gpi* kódující glukózu-6-fosfoizomerázu, který je řízen samostatným, silně konzervovaným σ^{70} promotorem [30].

Tabulka 8: Průměrné hodnoty C_i biologických replikátů obou kmenů v poměru k C_i referenčnímu genu *gyrA* ($C_{i,gyrA}/C_{i,genu}$).

<i>has</i> operon	ATCC35246				CO4A			
Označení genu	4 h	8 h	12 h	16 h	4 h	8 h	12 h	16 h
SeseC_00231:hasA	1,29	1,28	1,26	1,25	1,18	1,22	1,24	1,25
SeseC_00232:ugd	1,07	1,06	1,06	1,06	1,06	1,11	1,12	1,16
SeseC_00233:galU	1,12	1,11	1,12	1,10	1,06	1,08	1,18	1,17
SeseC_00234:glmU	1,07	1,06	1,06	1,04	1,03	1,01	1,08	1,05
SeseC_00235:gpi	1,18	1,17	1,16	1,14	1,12	1,13	1,16	1,15
SeseC_01348:gyrA	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00



Graf 1: Normalizované C_t hodnoty genů *has* operonu kmene CO4A. *has* operon je regulován dvěma konzervovanými promotory. Míra exprese odpovídá předpokladu. Gen kódující *hasA* měl nejvyšší expresi ze všech sledovaných genů. Míra exprese genů klesá se vzdáleností od promotorové oblasti, tak jak ukazují data v grafu. Výjimku tvoří gen *Sesec_00235* (*gpi*), který kóduje enzym klíčový pro dráhy energetického metabolismu. Je tedy pravděpodobná možnost samostatné regulace a proto je před genem umístěna druhá promotorová sekvence regulující expresi pouze *gpi* genu [30].



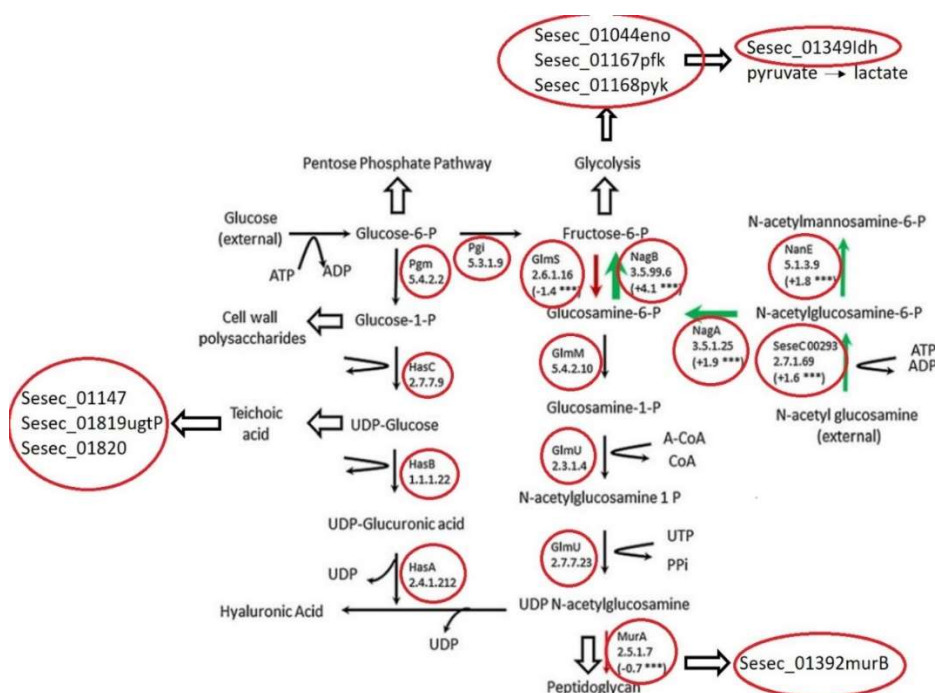
Graf 2: U kmene ATCC35246 byl vývoj exprese genů stejný jako u kmene CO4A. Dokonce u ATCC35246 byla relativní míra exprese *hasA* ve 4. hodině kultivace vyšší než u CO4A. Ostatní geny měly míru exprese srovnatelnou s CO4A.

V této kapitole výsledků byla zhodnocena exprese genů *has* operonu u kmene produkčního CO4A a referenčního ATCC35246. Exprese genů je vyšší než u referenčního genu *gyrA*. Signifikantně vyšší pak

v případě genů *hasA* a *gpi*. Geny *has* operonu jsou pod kontrolou dvou nezávislých promotorů [30]. Pod kontrolou druhého silně konzervovaného promotoru σ^{70} je pouze gen *gpi*. Jeho exprese je nižší než exprese genu *hasA*, nicméně výrazně vyšší než exprese zbylých genů *has* operonu. Gen *hasA* kódující hyaluronan syntázu je exprimován s nejvyšší intenzitou. Je zařazen na první místo hned po sekvenci prvního promotoru (exprese genů klesá se vzdáleností od sekvence promotorové části [30]). Co se týká změny míry exprese v čase, nepozorovali jsme žádný výrazný trend u kmene CO4A, ani u kmene ATCC35246. Celkově to vypadá, že exprese genů *has* operonu je u obou sledovaných kmenů srovnatelná. Avšak u analýzy metodou DNA čipů (kap. 3.3.1) byl zaznamenán signifikantní nárůst míry exprese genů *has* operonu u kmene CO4A v porovnání s referenčním kmenem ATCC35246. Mohlo to být způsobeno rozdílným stavem buněk při kultivaci. Počet buněk dodaných v inokulu by mělo být velmi podobné (ověřeno spektrofotometricky), nicméně kvalita kultury mohla být odlišná (u kmene ATCC35246 horší) a tím mohla být kultivace zpožděná. Metoda DNA čipů také může ve vyšší míře vykazovat falešně pozitivní výsledky, právě proto je hojně využívána v kombinaci s metodou qPCR. Bakteriální buňky kmene ATCC35246 však produkují výrazně méně HA než buňky produkčního kmene CO4A (kap. 3.4.3). Protože u studovaných kmenů metodou qPCR nebyla zjištěna signifikantní změna exprese genů *has* operonu, je možné konstatovat, že biosyntéza kyseliny hyaluronové je v nich regulována i jiným způsobem.

3.4.2 Vliv N-acetylglukosaminu na expresi vybraných skupin genů

Již dříve byl v literatuře publikován pozitivní vliv suplementace média GlcNAc na produkci HA u bakterií rodu *Streptococcus* [5]. Na následujícím schématu (obr. 11) jsou vybrané geny vykresleny v souvislosti s metabolickými drahami HA. U nepřímě zapojených metabolických drah se jedná především o enzymy zapojené v syntéze buněčné stěny (peptidoglykanu, litoteichoové kyseliny) a do energetického metabolismu buňky.



Obrázek 11: Geny označené červeným kroužkem byly vybrány jako potenciálně zajímavé pro studium jejich exprese. [upraveno dle 5]

Byly provedeny kultivace bakteriálních kmenů CO4A a ATCC35246 v kultivačním médiu suplementovaném N-acetylglukosaminem (0,5 g/l) a v kultivačním médiu bez suplementace. qPCR byla nastavena dle odpovídajících parametrů. Samozřejmostí bylo zařazení negativní kontroly, pro kterou byla

použita jako templát cDNA získaná přepisem RNA z bakterie *E. coli DH5α* a primery pro gen *hasA*, který se u *E. coli* nevyskytuje. Získaná data byla dále analyzována.

Analyzá změn relativní genové exprese metodou $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$

Získané C_t hodnoty byly normalizovány k referenčnímu genu *gyrA* a byla provedena analýza relativních změn genové exprese metodou $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ [64]. Výsledné hodnoty pro 1. biologický replikát obou kmenů jsou uvedeny v tabulce 9. Hodnoty získané metodou $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ definují relativní změny exprese genu ve vztahu k referenčnímu genu a kontrolní kultivaci [64].

Tabulka 9: Hodnoty relativní změny exprese vybraných skupin genů získané metodou $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$

Gen	Fold change 1. biologického replikátu							
	CO4A				ATCC			
	6	9	12	16	6	9	12	16
<i>gyrA</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
Sesec_00231 <i>hasA</i>	1,11	1,23	0,44	0,46	1,15	1,05	0,83	0,74
Sesec_00232 <i>ugd</i>	1,18	1,18	0,71	0,48	0,69	0,78	1,42	1,07
Sesec_00233 <i>galU</i>	1,15	1,25	0,22	0,26	1,23	0,80	0,73	0,67
Sesec_00234 <i>glmU</i>	1,17	1,81	0,24	0,40	0,96	0,72	0,72	0,74
Sesec_00235 <i>gpi</i>	1,04	1,08	0,43	0,55	1,01	1,07	1,04	1,03
Sesec_00293	1,00	1,33	0,44	0,65	1,22	0,72	1,09	0,91
Sesec_00296 <i>nanE</i>	1,17	1,57	0,78	0,99	0,74	0,91	1,02	0,74
Sesec_00467 <i>pgm</i>	1,11	1,30	0,63	0,56	1,02	0,80	0,89	0,70
Sesec_00575 <i>nagA</i>	0,91	1,19	0,65	0,80	1,23	0,71	1,19	1,03
Sesec_00795 <i>nagB</i>	1,18	1,23	0,42	0,32	0,67	0,58	0,70	0,53
Sesec_00830 <i>murA</i>	1,14	1,70	0,65	0,95	1,12	0,91	1,28	1,14
Sesec_01044 <i>eno</i>	1,09	1,25	0,53	0,54	1,35	1,11	0,98	0,93
Sesec_01147	1,25	1,33	0,49	0,47	1,11	0,70	1,22	1,01
Sesec_01167 <i>pfk</i>	1,22	1,40	0,33	0,24	1,03	0,90	1,14	0,97
Sesec_01168 <i>pyk</i>	1,01	1,03	0,47	0,39	0,85	0,88	1,18	0,99
Sesec_01170 <i>glmS</i>	1,16	1,81	0,52	0,87	0,79	0,80	0,75	0,69
Sesec_01349 <i>ldh</i>	0,89	1,19	0,75	0,83	0,84	0,85	1,19	1,06
Sesec_01392 <i>murB</i>	1,03	0,75	0,55	0,60	0,52	0,45	0,97	0,95
Sesec_01569 <i>glmM</i>	0,76	0,94	0,68	0,78	1,03	0,73	0,79	0,75
Sesec_01819 <i>ugtP</i>	0,70	1,27	0,41	0,51	0,93	0,97	1,09	0,75
Sesec_01820	1,07	1,38	0,77	0,92	0,65	0,64	0,84	0,89

Hlavní studovanou metabolickou dráhou byla biosyntéza HA. Geny kódující enzymy v ní zapojené, se nacházejí v sekvenci za sebou v jednom operonu. *has* operon byl pojmenován podle produkce HA. První čtyři geny jsou regulovány jedním promotorem, a proto můžeme očekávat obdobnou reakci na změnu kultivačního prostředí (obohacení média GlcNAc) [30]. Skutečně u zmíněných genů kmene CO4A sledujeme v prvních hodinách (6. a 9. hodině) kultivace navýšení míry exprese v porovnání s kontrolní kultivací (u Sesec_00231 *hasA* o 11 % a 23 %, u Sesec_00232 *ugd* o 18 % v obou případech, u Sesec_00233 *galU* o 15 % a 25 %, u Sesec_00234 *glmU* o 17 % a 81 %). U kmene ATCC35246 tento efekt nepozorujeme zřejmě proto, že GlcNAc je využíván v pozdější fázi kultivace. Gen Sesec_00234 (*glmU*) v CO4A má ve své nukleotidové sekvenci bodovou mutaci (kap. 3.2, tab. 2), která ovšem nepůsobuje změnu na proteinové

sekvenci. Vliv této mutace na expresi *glmU* bude pravděpodobně minimální, nicméně ji nelze zcela vyloučit [55]. U genu kódujícího *glmU* byl u CO4A pozorován výrazný nárůst exprese v 9. hodině kultivace (81 %). Geny kódující *glmU* a *galU* mají v sekvenci genomu i svou druhou kopii (homologní sekvenci). Ta může souviset s výrazným nárůstem exprese *glmU* v CO4A a mohla by vést k vyšší koncentraci enzymu syntetizujícího prekurzor (GlcNAc) syntézy HA. V případě genu *Sesec_00233 (galU)* byla v jeho kopii identifikována SNV mutace, kdy došlo i ke změně AMK sekvence (Ala→Thr). Především u kmene ATCC35246 ve 4. hodině kultivace byl sledován nárůst u *galU* o 23 %. Oproti tomu přidavek GlcNAc do média neměl vliv na expresi *Sesec_00235 (gpi)*. Ke konci kultivace (ve 12. a 16. hodině) pozorujeme celkový pokles exprese. Kultura se dostává do stacionární fáze růstu, kultivační podmínky se zhoršují a může docházet k intenzivnější degradaci RNA. Zhoršení kultivačních podmínek spočívá především ve změně pH (například vysoká produkce laktátu [27]), jeho vyrovnáváním pomocí NaOH a s tím spjatými změnami v osmotickém prostředí buněk. Dále dochází v důsledku vysoké viskozity média na konci kultivace ke zhoršení toku živin kvůli ztíženým podmínkám míchání a vzdušnění v reaktoru. Stres buněk může mít také vliv na míru exprese jednotlivých genů a na adaptaci organismu na jiné prostředí, kde kapsule již ztrácí svou úlohu.

U kmene ATCC35246 není soudržnost v míře exprese genů *has* operonu tak výrazná. Zejména u genu *Sesec_00232 (ugd)* data poněkud překvapivě ukazují nižší expresi oproti kontrole bez GlcNAc v prvních hodinách kultivace a naopak výrazný nárůst exprese ve 12. hodině experimentu. Pokud by se pokles exprese genu *Sesec_00232* u ATCC35246 projevil i na proteinové úrovni mohl by zabrzdit navazující procesy, což by v konečném důsledku mohlo mít za následek snížení produkce HA. Vzhledem k tomu, že jeho substrátem je UDP-glukóza, tak jeho nízká exprese v počátku kultivace by mohla mít vliv na navýšení syntézy struktur buněčné stěny. Je pravděpodobné, že kmen ATCC35246 v první polovině kultivace upřednostňuje syntézu buněčné stěny před zvýšenou produkcí HA, která může být zpožděná. Tento kmen tak za daných kultivačních podmínek produkuje méně HA než kmen CO4A.

U dalších genů kmene CO4A zapojených přímo v drahách syntézy HA pozorujeme stejný expresní vývoj (*Sesec_00467 pgm*, *Sesec_01167 pfk*). U genu *Sesec_001167 (pfk)* pozorujeme v 9. hodině kultivace nárůst o 40 % v porovnání s kontrolní kultivací. Enzym je zapojen také v drahách glykolýzy. Metabolitem, který je odváděn tím směrem a postupně zpracováván enzymem *pfk* společně s geny *Sesec_01168 (pyk)* a *Sesec_01044 (eno)* je fruktóza-6-P. U dalších dvou genů *Sesec_01168 (pyk)* a *Sesec_01044 (eno)* nepozorujeme tak výrazné navýšení exprese jako u *Sesec_01167 (pfk)*. Enzym *pfk* je centrálním enzymem glykolýzy. Enzym *eno* mění glycerát na fosfoenolpyruvát a na tuto reakci navazuje enzym *pyk*, který katalyzuje změnu fosfoenolpyruvátu na pyruvát. Zmíněná enzymatická posloupnost odvádí metabolity z hlavních drah až k odbourávání pyruvátu na laktát za katalýzy enzymu *ldh* (*Sesec_01349*), který má z uvedených genů nejnižší expresi. Útlum genové exprese v konečných hodinách kultivace (12. a 16. hodině) je u kmene CO4A společným jevem, důvodem mohou být již zmíněné nepříznivé kultivační podmínky. U kmene ATCC35246 vykazovaly geny *Sesec_01167 (pfk)* a *Sesec_01168 (pyk)* signifikantní nárůst exprese jen ve 12. hodině kultivace (14 % *pfk* a 18 % *pyk*), nejspíše bude kultivace a s ní produkce HA v porovnání s kmenem CO4A opožděná. Dále byl zaznamenán nárůst exprese u genu *Sesec_01044 (eno)* o 35 % v 4. hodině kultivace. Gen *Sesec_01349 (ldh)* měl výraznější nárůst exprese ve 12. hodině kultivace. Zde můžeme pozorovat snižující se míru navýšení exprese u kaskády po sobě jdoucích enzymatických reakcí s časem kultivace: *eno* (35 % ve 4. hodině) → *pyk* (18 % ve 12. hodině) → *ldh* (19 % ve 12. hodině).

Ústředním aspektem tohoto experimentu bylo sledování vlivu externě dodaného *N*-acetylglukosaminu na změny exprese vybraných genů. Zpracování externě dodaného GlcNAc je zajištěno mimo jiné i geny *Sesec_00293*, *Sesec_00575 (nagA)* a *Sesec_00795 (nagB)*. Vysoký nárůst exprese v porovnání s kontrolní kultivací byl zaznamenán u genu *Sesec_00293* v 9. hodině kultivace (33 % navýšení). Tento gen zajišťuje první zpracování externího GlcNAc v buňkách. Navazuje na něj gen kódující *nagA* enzym, který přivádí

GlcNAc do linie syntézy jednoho z prekurzorů produkce HA. U *nagA* bylo v 9. hodině kultivace zjištěno navýšení exprese o 19 %. Navazuje na něj gen kódující *nagB* enzym, který odvádí metabolit přes fruktózu-6-P směrem do drah glykolýzy. Navýšení jeho exprese bylo v první polovině kultivace signifikantní (23 %). Enzym *glmS* (Sesec_001170) kompetuje s enzymem *nagB* a vrací fruktózu-6-P zpět do dráhy syntézy HA. V 9. hodině kultivace dosahovala jeho míra exprese navýšení o 81 %. Z toho vyplývá, že i když aktivita genu vedoucí k odchodu důležitého metabolitu mimo dráhy syntézy HA (Sesec_00795, *nagB*) byla vysoká (23 %), exprese genu, kódujícího enzym *glmS*, katalyzujícího opačnou reakci byla vyšší (81 %) a metabolit byl zřejmě intenzivněji přiváděn do drah syntézy HA. Aktivita genů spojených s externím GlcNAc se zvyšovala přibližně do poloviny kultivace, až mezi 9. a 12. hodinou kultivace pravděpodobně dosahovala svého vrcholu. Od 12. hodiny exprese genů zpravidla klesala pod úroveň kontrolní kultivace. U kmene ATCC35246 byl pozorován nárůst exprese genu Sesec_00293 už ve 4. hodině experimentu. Stejně tak byl zjištěn nárůst ve 4. hodině u genu Sesec_00575 (*nagA*). Co by naznačovalo, že ke zpracování GlcNAc mohlo docházet dříve než u kmene CO4A. Nicméně pak nastává výrazný propad míry exprese v porovnání s kontrolní kultivací. Gen Sesec_00795, (*nagB*) má expresi velmi nízkou po celou dobu kultivace, stejně tak jako gen Sesec_001170 (*glmS*). Podle všech indicií je velmi pravděpodobné, že externě dodaný GlcNAc u kmene ATCC35246 odchází v podobném množství jak do drah glykolýzy, tak biosyntézy HA.

Z počátku experimentu buňky kmene CO4A zřejmě upřednostňovaly metabolismus aminocukrů a nukleotidů, kam byl GlcNAc směřován genem *nanE* (Sesec_00296). *nanE* měl v 9. hodině kultivace navýšení exprese o 57 % v porovnání s kontrolní kultivací. Tento gen má v genomu homologní sekvenci Sesec_00291. U analýzy metodou DNA čipů byla prokázána zvýšená exprese u obou kopií genu (Sesec_00296 měl nárůst exprese o 84 % a Sesec_00291 měl nárůst exprese o 42 %), nicméně to bylo při kultivaci bez suplementace GlcNAc a ve srovnání kmene CO4A vůči kmenu ATCC35246. Navíc v sekvenci Sesec_00296 byla identifikována mutace (kap. 3.2, tab. 2), která posunula čtecí rámec a pozměnila posledních 55 AMK. Změna mohla mít vliv na expresi genu a v konečném důsledku na funkčnost proteinu. Jeho míra exprese v porovnání s ATCC35246 je velmi vysoká, což mohlo být způsobeno vyšší potřebou enzymu u kmene CO4A.

Významný nárůst, v porovnání s kontrolní kultivací, byl pozorován i u genu Sesec_00830, který kóduje enzym *murA* odvádějící *N*-acetylglukosamin do drah syntézy peptidoglykanu. V první polovině kultivace (v 9. hodině) byl nárůst exprese tohoto genu u kmene CO4A o 70 %. Peptidoglykan jako stavební jednotka buněčné stěny bude v počátcích kultivace silně upřednostňován i vzhledem k tomu, že gen Sesec_00231 (*hasA*) měl v 9. hodině kultivace nárůst exprese jen 23 %. Oproti tomu u kmene ATCC35246 dosahoval gen Sesec_00830 (*murA*) nárůstu exprese (28 %) v porovnání s kontrolní kultivací až ke konci kultivace (12. hodině). Ve 4. hodině byl jeho nárůst exprese (12 %) porovnatelný s genem kódujícím enzym *hasA* (15 %). Produkce HA může být ovlivněna i odlivem meziproductů do drah syntézy kyseliny lipoteichoové. V tomto směru byly sledovány geny Sesec_01820, který měl v 9. hodině kultivace nárůst exprese 38 % a Sesec_01819 (*ugtP*), který měl v tomtéž čase nárůst exprese 27 %. Lipoteichoová kyselina je stejně jako kyselina hyaluronová jedním z virulentních faktorů a povrchový protein [59, 65].

U kmene ATCC35246 měly sledované geny většinou nižší míru exprese ve srovnání s kontrolní kultivací než geny kmene CO4A. Můžeme konstatovat, že u kmene ATCC35246 nebyl pozorován jednoznačný pozitivní vliv dodaného GlcNAc na míru exprese vybraných genů. U kmene CO4A bylo pozorováno navýšení exprese genů *has* operonu v počátcích kultivace. GlcNAc jako prekurzor syntézy HA se po suplementaci do média mohl inkorporovat přímo do HA a navyšovat tak výtěžek v porovnání s kontrolní kultivací bez GlcNAc. Nicméně schopnost inkorporace může být u obou kmenů odlišná. Zatímco u kmene CO4A by mohla větší část suplementovaného GlcNAc přecházet do HA, kmen ATCC35246 ho nebude schopný využít s takovou efektivitou a spíše ho začlení do drah energetického metabolismu. Odlišnost

genomická a transkriptomická, kterou v práci studuji u obou kmenů, bude mít vliv na flux GlcNAc. Utilizace tohoto prekursoru bude u obou kmenů odlišná, předpokladem je vždy určitá genetická predispozice, míra transkripce katabolických a anabolických genů v drahách zpracování GlcNAc a další úrovně regulace. Svůj význam určitě mají podmínky kultivace, povrchové proteiny, plasticita a složení membrány, transportní systémy, rychlost zpracování aj.

3.4.3 Výtěžek HA z kultivací

Po ukončení kultivací bylo zjištěno, jaké množství kyseliny hyaluronové bylo vyprodukováno. K získání výtěžku HA byla použita metoda srážení. Výchozí množství kultury po fermentaci bylo 250 ml. Výtěžek z objemu byl následně přepočítán na litr média, bylo stanoveno množství sušiny a procentuální nárůst výtěžku HA z kultivace s *N*-acetylglukosaminem v porovnání s kontrolní kultivací. Hodnoty výtěžků kultivací pro kmen ATCC35246 jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10: Výtěžky kyseliny hyaluronové z provedených kultivací u kmene ATCC35246.

Kmen ATCC35246	Kultivace	Výtěžek HA [g/250 ml]	Výtěžek HA [g/l]	Sušina [%]	Výtěžek HA na 100 % sušiny [g]
Fermentor 1	GlcNAc	1,01	4,04	93,28	3,77 (+0,27 g)
Fermentor 2	Kontrola	0,94	3,76	93,16	3,50
Fermentor 3	GlcNAc	1,07	4,28	91,74	3,93 (+0,39 g)
Fermentor 4	Kontrola	0,94	3,76	94,22	3,54
Fermentor 5	GlcNAc	1,02	4,08	94,07	3,84 (+0,33 g)
Fermentor 6	Kontrola	0,94	3,76	93,46	3,51

Z předchozích výsledků qPCR reakcí, kde byla sledována míra a vývoj exprese vybraných genů metabolických drah syntézy HA a drah k nim přidružených, nebyl patrný žádný specifický trend míry exprese. Nemůžeme proto říci, že by *N*-acetylglukosamin měl u kmene ATCC35246 dle hladin exprese jednoznačně pozitivní vliv na produkci HA. Nicméně z výsledků srážecích reakcí je patrný nárůst výtěžku HA na litr média. V případě prvního biologického replikátu¹ (fermentor 1 a 2) byl nárůst výtěžku o cca 7 %, u druhého biologického replikátu (fermentor 3 a 4) byl nárůst výtěžku cca o 13 % a v případě třetího biologického replikátu (fermentor 5 a 6) byl nárůst výtěžku v porovnání s kontrolní kultivací cca o 8 %.

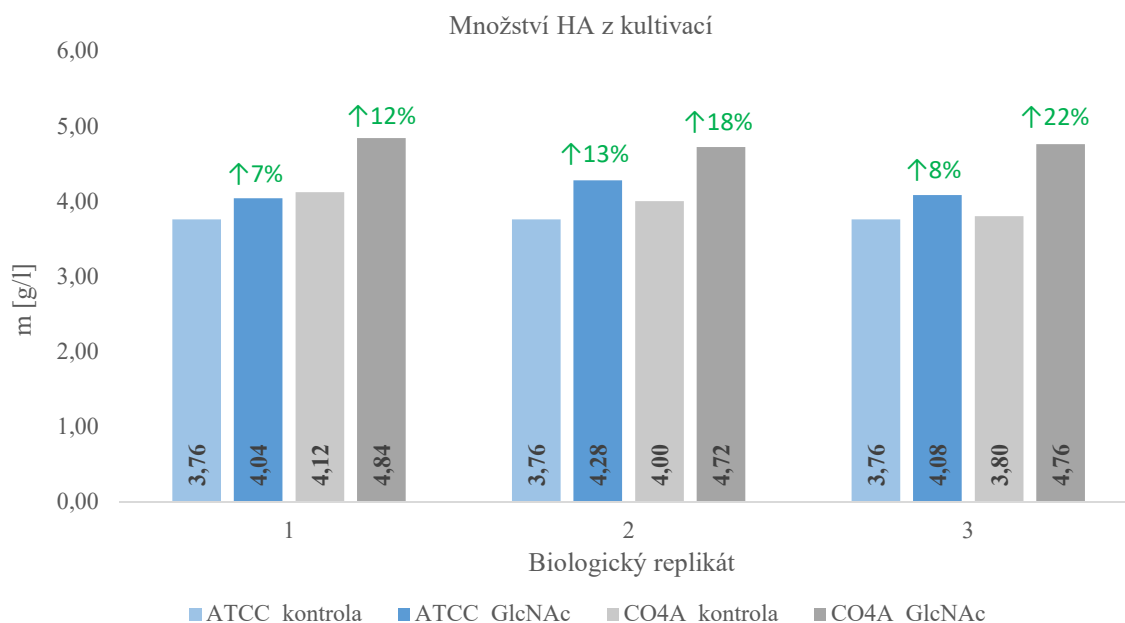
Také po ukončení kultivací s kmenem CO4A bylo zjišťováno, jaké množství kyseliny hyaluronové bylo vyprodukováno. Hodnoty výtěžků kultivací jsou uvedeny v tab. 11.

*Tabulka 11: V tabulce jsou uvedeny výtěžky kyseliny hyaluronové z provedených kultivací se suplementací *N*-acetylglukosaminem (GlcNAc) v porovnání s kontrolní kultivací bez GlcNAc u kmene CO4A.*

Kmen CO4A	Kultivace	Výtěžek HA [g/250 ml]	Výtěžek HA [g/l]	Sušina [%]	Výtěžek na 100 % sušiny [g]
Fermentor 1	GlcNAc	1,21	4,84	90,35	4,37 (+0,51 g)
Fermentor 2	Kontrola	1,03	4,12	93,75	3,86
Fermentor 3	GlcNAc	1,18	4,72	93,85	4,43 (+0,78 g)
Fermentor 4	Kontrola	1,00	4,00	91,26	3,65
Fermentor 5	GlcNAc	1,19	4,76	92,24	4,39 (+0,96 g)
Fermentor 6	Kontrola	0,95	3,80	90,39	3,43

¹ Fermentory 1 a 2 byly inokulovány z jedné prekultury, aby byl stav v počátku experimentu srovnatelný jak u kultivace s GlcNAc, tak i u kontrolní kultivace. Stejně bylo inokulováno i v případě dalších fermentorů u kmene ATCC35246 a i u kmene CO4A.

Z předchozích výsledků analýzy metodou qPCR můžeme soudit, že suplementace kultivačního média *N*-acetylglukosaminem měla u produkčního kmene CO4A pozitivní vliv na expresi genů zapojených v produkci HA. Ke stejným závěrům můžeme dojít i z výsledků srážecích reakcí, kde je patrný nárůst výtěžku HA na litr média. V případě prvního biologického replikátu (fermentor 1 a 2) byl nárůst výtěžku o cca 12 %, u druhého biologického replikátu (fermentor 3 a 4) byl nárůst výtěžku cca o 18 % a v případě třetího biologického replikátu (fermentor 5 a 6) byl nárůst výtěžku v porovnání s kontrolní kultivací cca o 22 %. Srovnání obou kultivací je uvedeno v grafu 3.



Graf 3: Z kultivací byla získána HA srážecí metodou. Z grafu je viditelné, že množství získané kyseliny hyaluronové u kultivací se suplementovaným *N*-acetylglukosaminem byla v porovnání s kontrolními kultivacemi vyšší.

U našeho experimentu s kultivací s přidavkem GlcNAc jsme se inspirovali v článku z roku 2013 [5], kde se zaměřovali na vliv extracelulárních prekurzorů HA na její molekulovou hmotnost. Pracovali mimo jiné i se sbírkovým kmenem *S. zooepidemicus* ATCC35246, který ve své práci používám jako referenční kmen. Zjistili, že přidavek GlcNAc do kultivačního média má pozitivní vliv na množství produkované HA, ale molekulová hmotnost klesá [5]. Nebylo zjištěno signifikantní navýšení exprese u genů zapojených v drahách biosyntézy HA [5]. K jejich seznamu vybraných metabolických drah byly doplněny námi vybrané geny zájmu (na základě dat z analýzy na DNA čipech), aby bylo pokryto co nejvíce možností, které by mohly ovlivnit produkci HA. Došli jsme k závěru, že suplementace kultivace *N*-acetylglukosaminem (prekurzor syntézy HA) může pozitivně ovlivňovat expresi genů ve sledovaných metabolických drahách u kmene CO4A. V porovnání s kontrolní kultivací, kam nebyl dodán *N*-acetylglukosamin, byly hodnoty exprese u produkčního kmene nižší než u kultivací se suplementací GlcNAc. Výtěžek HA z těchto kultivací zaznamenal ve všech třech opakování signifikantní nárůst, a to o 12 %, 18 % a 22 %. Rozdíly ve výtěžku napříč kultivacemi jsou výrazné hlavně v případě první a třetí kultivace. Důvodem byl pravděpodobně stav buněk na počátku kultivace. Inokulováno bylo stejné množství buněk u všech kultivací (určeno spektrofotometricky), ale vitálnost a celková kvalita kultury se mohly lišit. To mohlo prodloužit lag fázi kultivace a tím zpozdit celou kultivaci. Následkem mohl být nižší výtěžek HA.

U kmene referenčního ATCC35246 jsme jednoznačný trend ve vývoji míry exprese v průběhu kultivace neidentifikovali. I přes to byl zaznamenán nárůst výtěžku HA v porovnání s kontrolními kultivacemi (o 7 %, 13 % a 8 %). V případě druhého replikátu byl nárůst výtěžku HA také signifikantní (13 %). Předpokladem

našich experimentů byl vysoce efektivní proces přepisu sekvence mRNA do sekvence proteinu. V reálném systému míru exprese ovlivňují z velké části i procesy předcházející translaci, dále může docházet k degradaci mRNA, nebo může být míra přepisu sekvence do proteinu méně efektivní z důvodu přítomnosti mutací atd. Nicméně na základě získaných dat můžeme konstatovat, že při kultivaci CO4A v médiu s GlcNAc byl zjištěn signifikantní nárůst exprese genů zapojených v metabolismu HA, jenž oproti ATCC35246 mohl zapříčinit vyšší výtěžek HA.

Koncentrace suplementovaného GlcNAc v kultivačním médiu byla 0,5 g/l. Kultivace probíhaly v objemu 0,5 l, tudíž reálné množství extracelulárního GlcNAc, které bylo buňkami využitelné, odpovídá 0,25 g. Pokud budeme uvažovat, že zcela dochází k inkorporaci dodaného GlcNAc do řetězce HA, došlo by ke zvýšení výtěžku HA o 0,5 g (0,25 g GlcNAc + 0,5 g GlcUA). Kmen ATCC35246 vykazoval navýšení produkce HA v průměru o cca 0,33 g, což by znamenalo využití 0,165 g GlcNAc (66 %) z 0,25 g dostupného GlcNAc. Jsme tedy v rozmezí konverze 0-100 % a navýšení produkce HA mohlo být způsobeno pouze dodáním extracelulárního GlcNAc do média, Zbylé množství suplementu může být zároveň zpracováváno i jinými metabolickými drahami, např. glykolýzou.

U kmene CO4A však došlo v průměru k navýšení produkce HA o cca 0,75 g, což by znamenalo využití 0,375 g GlcNAc z 0,25 g dostupného GlcNAc. Zde by se tedy konverze dodaného GlcNAc pohybovala kolem 150 %. V případě kmene CO4A proto můžeme předpokládat, že se kromě konverze GlcNAc také uplatňuje jeho další regulační efekt na dráhy produkce HA či flux většího množství prekurzorů. Toto by mohlo být u CO4A způsobeno právě depresí metabolické dráhy syntézy kyseliny *N*-acetylneuraminové [56, 57, 58], z důvodu vnesené inzerce TA v sekvenci kódující predikovanou *N*-acetylmannosamin-6-fosfát-2-epimerázu (*nanE* gen). V této dráze je iniciační molekulou GlcNAc [57]. Pokud tedy jedna z cest zpracování GlcNAc není funkční, může to vést k posílení zbylých drah a to by mohlo vysvětlovat i zvýšenou expresi genů, které tento cukr zpracovávají. Navíc vidíme, že suplementace GlcNAc má u sledovaných genů kmene CO4A pozitivní efekt na nárůst exprese, což u původního kmene ATCC35246 nepozorujeme a zvyšuje se i exprese genu *nanE* (Sesec_00296).

4 ZÁVĚR

Práce se zabývala studiem exprese genů za použití fyzikálně chemických metod (WGS, NGS, qPCR, DNA čipy) na poli molekulární biologie. Studován byl produkční kmen *S. zooepidemicus* CO4A, který využívá společnost Contipro a.s. při komerční přípravě kyseliny hyaluronové pro kosmetický a farmaceutický průmysl. Jako referenční kmen byl použit sbírkový kmen *S. zooepidemicus* ATCC35246 [50].

Genom *S. zooepidemicus* CO4A byl úspěšně sekvenován a za použití specifického softwaru byl sestaven do kompletní sekvence. Výsledkem byl genom o velikosti 2 167 251 párů bází a v něm bylo identifikováno 1 999 kódujících oblastí. Obsah bází GC byl 41,7 %. Analýzou získaného genomu bylo detekováno 83 relevantních variant s frekvencí vyšší než 90 %. Z toho se jednalo v 59 případech o SNV mutace a ve 24 případech o indel mutace. Při analýze genomu jsme se zaměřili na geny *has* operonu, kde byla nalezena mutace v kódující oblasti genu *Sesec_00234 (glmU)*. Byla identifikována také SNV mutace v kódující oblasti genu *Sesec_00255 (galU)*, který je druhou kopií genu *Sesec_00233 (galU)* nacházející se v *has* operonu.

Při studiu exprese genů celého genomu metodou DNA čipů jsme se zaměřili na skupiny specifických metabolických drah. Mimo jiné i na dráhy produkce HA (*has* operon) a vybrané geny potenciálně ovlivňující její produkci.

U drah energetického metabolismu buňky (dráhy metabolismu aminocukrů) byla zjištěna zajímavá kaskáda genů s vysokou mírou exprese v porovnání s referenčním kmenem, která vedla k syntéze UDP-GlcNAc. Kaskáda zpracovává substrát fruktózu-6-P, která přichází z glykolýzy, nebo je získávána také z extracelulární sacharózy jako uhlíkatého zdroje pro kultivaci. Posloupnost genů a jejich navýšení míry exprese bylo následující: *Sesec_01170 (glmS)*, navýšení o 37 % → *Sesec_01569 (glmM)*, navýšení o 20 % → *Sesec_01989/00234 (glmU)*, navýšení o 30 % → *Sesec_01989/00234 (glmU)*, navýšení o 28 %. Gen *glmU* kóduje bifunkční enzym a katalýza probíhá za účasti C-terminální domény, nebo za účasti N-terminální domény enzymu, podle toho jakou reakci katalyzuje. Výsledkem byla aktivovaná forma UDP-*N*-acetylglukosamin [63], který je prekurzorem syntézy HA a jeho vyšší koncentrace pozitivně ovlivňovala její produkci.

Metodou DNA čipů lze sledovat expresi velkého množství genů současně. Nevýhodou však je její nedostatečná citlivost a vyskytující se falešně pozitivní výsledky. Proto byly geny, které se podílejí na syntéze HA, sledovány i za pomoci metody qPCR. Prvním krokem bylo stanovení referenčního genu (*gyrA*), ke kterému se vztahovaly výsledné hodnoty C_t . U genů *has* operonu kmene CO4A a kmene ATCC35246 nebyla zjištěna signifikantní změna exprese genů. Celkově můžeme říct, že exprese genů *has* operonu u obou sledovaných kmenů je srovnatelná. Bakteriální buňky kmene ATCC35246 však produkují méně HA než buňky produkčního kmene CO4A. Biosyntéza kyseliny hyaluronové byla zřejmě regulována i jiným mechanismem než jen genovou expresí.

Jako další byl sledován vliv suplementace GlcNAc do kultivačního média. U kmene ATCC35246 měly sledované geny většinou nižší, nebo srovnatelnou míru exprese ve srovnání s kontrolní kultivací než geny kmene CO4A. Můžeme konstatovat, že u kmene ATCC35246 nebyl pozorován jednoznačný pozitivní vliv dodaného GlcNAc na míru exprese vybraných genů. I přes to byl pozorován nárůst výtěžku HA v porovnání s kontrolními kultivacemi, a to o 7 %, 13 % a 8 %. U kmene CO4A docházelo k navýšení míry exprese genů *has* operonu a tudíž můžeme říci, že suplementace měla pozitivní dopad na vývoj jejich exprese. U výtěžku HA z těchto kultivací byl zaznamenán signifikantní nárůst ve všech třech opakování, a to o 12 %, 18 % a 22 %. Utilizace tohoto prekurzoru bude u obou kmenů odlišná, předpokladem je vždy určitá genetická predispozice, míra transkripce katabolických a anabolických genů v drahách zpracování GlcNAc a další úrovně regulace. Svůj význam určitě mají podmínky kultivace, povrchové proteiny, plasticita a složení

membrány, transportní systémy, rychlost zpracování aj. Experiment by se v budoucnu mohl rozšířit i o druhý prekursor GlcUA.

U kmene CO4A měl GlcNAc zřejmě i signální a regulační funkci. Vzhledem k tomu, že koncentrace GlcNAc byla 0,5 g/l a kultivace probíhala v objemu 0,5 l, bude celkové množství dostupného GlcNAc 0,25 g. V průměru došlo u kultivací CO4A k nárůstu výtěžku HA o cca 0,75 g, což by znamenalo využití 0,375 g GlcNAc z 0,25 g dostupného GlcNAc (150 %). Konverze GlcNAc je vyšší než 100 %. Můžeme se domnívat, že byl konvertován všechny externě dodaný GlcNAc a navíc tato suplementace vyvolala další navýšení produkce HA. Uplatňuje se tudíž také jeho další regulační efekt GlcNAc na dráhy produkce HA či flux většího množství prekursorů. Toto by mohlo být u CO4A způsobeno právě depresí metabolické dráhy syntézy kyseliny *N*-acetylneuraminové [56, 57, 58], z důvodu vnesené inzerce TA v sekvenci kódující gen *nanE*. Pokud tedy jedna z cest zpracování GlcNAc není funkční, může to vést k posílení zbylých drah a to by mohlo vysvětlovat i zvýšenou expresi genů, které tento cukr zpracovávají. U kmene ATCC35246 došlo v průměru k navýšení produkce HA o cca 0,33 g, což by znamenalo využití 0,165 g GlcNAc z 0,25 g dostupného GlcNAc (66 %). Jsme tedy v rozmezí konverze 0-100 %, což značí, že navýšení produkce HA bylo pravděpodobně způsobeno pouze konverzí extracelulárního GlcNAc z média.

V průběhu provádění experimentů bylo získáno velké množství dat, ze kterých lze vycházet při dalších experimentech. Je možné se zaměřit přímo na regulační a signální dráhy zapojené v produkci HA a v přidružených drahách. Může být prostudována skupina povrchových proteinů buněk, které mohou mít vliv na uchycení kapsule na buňkách, nebo na transport HA ven z buněk. Metodou DNA čipů byla sledována celogenomová exprese. Ze získaných dat je také možné vytipovat další kandidáty z řad genů, které by mohly ovlivňovat syntézu HA. Například pro bližší studium by byl zajímavý gen *nanE*. Měl velmi vysokou míru exprese (až 84 %) u všech analýz a provedených experimentů. Je jedním z centrálních genů metabolismu aminocukrů a biosyntézy kyseliny neuraminové. Byla u něj identifikována mutace a má svou druhou kopii v genomu (Sesec_00296, Sesec_00291). Dále by byl zajímavý gen Sesec_00255 (*galU*), který je druhou kopií genu Sesec_00233 v *has* operonu. Byla v něm identifikována také mutace SNV v kódující oblasti (kap. 3.2, tab. 2). Další kopie genu měla zřejmě zajistit stabilní množství enzymů nutných k produkci HA [30].

V práci bylo dosaženo stanovených cílů. Byla zjištěna sekvence genomu a byly identifikovány změny, které vznikly působením fyzikálního mutagenu (UV záření). Byl odhalen pozitivní vliv suplementace jedním z prekursorů HA (GlcNAc) a byl potvrzen i jeho pozitivní vliv na výtěžek HA. Na práci lze navázat a čerpat ze získaných dat při dalších analýzách a experimentech.

5 PŘEHLED LITERATURY

- [1] KIM, Jeong-Hyun, Seung-Jong YOO, Deok-Kun OH, Young-Gi KWEON, Dong-Woo PARK, Chul-Hoon LEE a Gwang-Hoon GIL. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 1996, **19**(6), 440-445 [cit. 2020-05-26]. DOI: 10.1016/S0141-0229(96)00019-1. ISSN 01410229. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022996000191>
- [2] YU, Huimin a Gregory STEPHANOPOULOS. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metabolic Engineering* [online]. 2008, **10**(1), 24-32 [cit. 2020-05-26]. DOI: 10.1016/j.ymben.2007.09.001. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717607000493>
- [3] KRAHULEC, Ján a Jana KRAHULCOVÁ. Increase in hyaluronic acid production by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* strain deficient in β -glucuronidase in laboratory conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, vol. 71, issue 4, s. 415-422. DOI: 10.1007/s00253-005-0173-9.
- [4] KRAHULEC, Ján, Marcela TLUSTÁ, Stanislav STUHLÍK a Ján TURŇA. Structure of the has Operon Promoter and the Effect of Mutations on the has Promoter Strength in *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Molecular Biotechnology*. 2011, vol. 49, issue 2, s. 166-175. DOI: 10.1007/s12033-011-9388-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12033-011-9388-4>
- [5] CHEN, Wendy Yiting, Esteban MARCELLIN, Jennifer A. STEEN a Lars Keld NIELSEN. The Role of Hyaluronic Acid Precursor Concentrations in Molecular Weight Control in *Streptococcus zooepidemicus*. *Molecular Biotechnology* [online]. 2014, **56**(2), 147-156 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1007/s12033-013-9690-4. ISSN 1073-6085. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12033-013-9690-4>
- [6] SARANRAJ, P a M.A NAIDU. Hyaluronic acid production and its applications: a review. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*. 2013, 4 (5), s. 853-859.
- [7] LIU, Long, Yanfeng LIU, Jianghua LI, Guocheng DU a Jian CHEN. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*. 2011, vol. 10, issue 1. DOI: 10.1186/1475-2859-10-99.
- [8] Armstrong DC, Johns MR. Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl Environ Microbiol*. 1997 Jul;63(7):2759-64. PMID: 16535649; PMCID: PMC1389204.
- [9] CHONG, Barrie Fong, Lars M. BLANK, Richard MCLAUGHLIN a Lars K. NIELSEN. Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, vol. 66, issue 4, s. 341-351. DOI: 10.1007/s00253-004-1774-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-004-1774-4>
- [10] VASVANI, Shyam, Pratik KULKARNI a Deepak RAWTANI. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **151**, 1012-1029 [cit. 2020-05-25]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.066. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181301936547X>
- [11] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN, Peter GEMEINER, J. SCHILLER, N. VOLPI, E. HRABÁROVÁ a L. ŠOLTÉS. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2006, vol. 29, issue 1, s. 1-34. DOI: 10.1002/9781118164792.ch1.
- [12] LIU, L., M. WANG, G. DU a J. CHEN. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Letters in Applied Microbiology*. 2008, vol. 46, issue 3, s. 383-388. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2008.02325.x.
- [13] Meyer, K. and Palmer, J.W. The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*. 1934, 107, 629-634.
- [14] LARSEN, Nancy E., Edward A. LESHCHINER, Edward G. PARENT, Julie HENDRIKSON-AHO, Endre A. BALAZS a Sadek K. HILAL. Hylan gel composition for percutaneous embolization. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1991, vol. 25, issue 6, s. 699-710. DOI: 10.1002/jbm.820250602. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.820250602>

- [15] LAURENT, Torvard C, Ulla BG LAURENT a J Robert E FRASER. The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunology and Cell Biology*. 1996, vol. 74, issue 2, A1-A7. DOI: 10.1038/icb.1996.32.
- [16] BALAZS, E. A.; SWEENEY, D. B.; MCPHERSON, A. New and controversial aspects of retinal detachment. *by McPherson, A., Harper and Row, New York*, 1968, 371.
- [17] CHONG, B a L NIELSEN. Amplifying the cellular reduction potential of. *Journal of Biotechnology*. 2003, vol. 100, issue 1, s. 33-41. DOI: 10.1016/s0168-1656(02)00239-0.
- [18] CHIEN, L.-J. a C.-K. LEE. Enhanced hyaluronic acid production in bacillus subtilis by coexpressing bacterial hemoglobin. *Biotechnology Progress*. 2007, vol. 0, issue 0. DOI: 10.1021/bp070036w.
- [19] WIDNER, R. BEHR, S. Von DOLLEN, M. TANG, T. HEU, A. SLOMA, D. STERNBERG, P. L. DEANGELIS, P. H. WEIGEL a S. BROWN. Hyaluronic Acid Production in Bacillus subtilis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, vol. 71, issue 7, s. 3747-3752. DOI: 10.1128/aem.71.7.3747-3752.2005.
- [20] CHIEN, Liang-Jung a Cheng-Kang LEE. Hyaluronic acid production by recombinant Lactococcus lactis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, vol. 77, issue 2, s. 339-346. DOI: 10.1007/s00253-007-1153-z.
- [21] MAO, Z. a R.R. CHEN. Recombinant Synthesis of Hyaluronan by Agrobacterium sp. *Biotechnology Progress*. 2007, vol. 0, issue 0. DOI: 10.1021/bp070113n.
- [22] YU, Huimin, Gregory STEPHANOPOULOS a Rainer M. FIGGE. Metabolic engineering of Escherichia coli for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metabolic Engineering*. 2008, vol. 10, issue 1, s. 163-193. DOI: 10.1007/7171_2006_059.
- [23] Kitchen JR, Cysyk RL. Synthesis and release of hyaluronic acid by Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochemical Journal*. 1995;309(Pt 2):649-656.
- [24] HARRINGTON, Dean J, Iain C SUTCLIFFE a Neil CHANTER. The molecular basis of Streptococcus equi infection and disease. *Microbes and Infection* [online]. 2002, 4(4), 501-510 [cit. 2020-05-03]. DOI: 10.1016/S1286-4579(02)01565-4. ISSN 12864579. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457902015654>
- [25] SEGURA, Mariela. Extracellular virulence factors of streptococci associated with animal diseases. *Frontiers in Bioscience* [online]. 2004, 9(1-3) [cit. 2020-05-03]. DOI: 10.2741/1287. ISSN 10939946. Dostupné z: <http://www.bioscience.org/2004/v9/af/1287/list.htm>
- [26] CLEARY, P. PATRICK; LARKIN, ANNICE. Hyaluronic acid capsule: strategy for oxygen resistance in group A streptococci. *Journal of bacteriology*, 1979, 140.3: 1090-1097.
- [27] ZHANG, Jinyu, Ning HAO, Guo-Qiang CHEN a A.-P. TAIRI. Effect of expressing polyhydroxybutyrate synthesis genes (phbCAB) in Streptococcus zooepidemicus on production of lactic acid and hyaluronic acid: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, vol. 71, issue 2, s. 222-227. DOI: 10.1007/s00253-005-0164-x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-0164-x>
- [28] PRASAD, Shashi Bala, K. B. RAMACHANDRAN a Guhan JAYARAMAN. Transcription analysis of hyaluronan biosynthesis genes in Streptococcus zooepidemicus and metabolically engineered Lactococcus lactis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, vol. 94, issue 6, s. 1593-1607. DOI: 10.1007/s00253-012-3944-0. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-012-3944-0>
- [29] WIDNER, B., R. BEHR, S. Von DOLLEN, M. TANG, T. HEU, A. SLOMA, D. STERNBERG, P. L. DEANGELIS, P. H. WEIGEL a S. BROWN. Hyaluronic Acid Production in Bacillus subtilis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, vol. 71, issue 7, s. 3747-3752. DOI: 10.1128/aem.71.7.3747-3752.2005.

- [30] BLANK, Lars M., Philip HUGENHOLTZ a Lars K. NIELSEN. Evolution of the Hyaluronic Acid Synthesis (has) Operon in *Streptococcus zooepidemicus* and Other Pathogenic *Streptococci*. *Journal of Molecular Evolution*. 2008, vol. 67, issue 1, s. 13-22. DOI: 10.1007/s00239-008-9117-1. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00239-008-9117-1>
- [31] CRATER, D. L., I. van de RIJN, Sebastian ALBERTI a Michael R. WESSELS. Hyaluronic Acid Synthesis Operon (has) Expression in Group A *Streptococci*. *Journal of Biological Chemistry*. 1995, vol. 270, issue 31, s. 975-978. DOI: 10.1007/978-1-4899-1825-3_229.
- [32] ALBERTI, Sebastian, Cameron D. ASHBAUGH, Michael R. WESSELS, Sebastian ALBERTI a Michael R. WESSELS. Structure of the has operon promoter and regulation of hyaluronic acid capsule expression in group A *Streptococcus*. *Molecular Microbiology*. 1998, vol. 28, issue 2, s. 975-978. DOI: 10.1007/978-1-4899-1825-3_229.
- [33] LEVIN, James C. a Michael R. WESSELS. Identification of *csrR/csrS*, a genetic locus that regulates hyaluronic acid capsule synthesis in group A *Streptococcus*. *Molecular Microbiology*. 1998, vol. 30, issue 1, s. 209-219. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.01057.x.
- [34] WEIGEL, Paul H., David CHIPMAN, Zéev BARAK, Stanislav ENGEL, Sharon MENDEL a Maria VYAZMENSKY. Functional Characteristics and Catalytic Mechanisms of the Bacterial Hyaluronan Synthases. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*. 2002, vol. 54, issue 4, s. 201-211. DOI: 10.1201/9780203913420.ch14.
- [35] WEIGEL, P. H. a P. L. DEANGELIS. Hyaluronan Synthases: A Decade-plus of Novel Glycosyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*. 2007-12-14, vol. 282, issue 51, s. 36777-36781. DOI: 10.1074/jbc.R700036200. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.R700036200>
- [36] DEANGELIS, Paul L. a Paul H. WEIGEL. Immunochemical Confirmation of the Primary Structure of Streptococcal Hyaluronan Synthase and Synthesis of High Molecular Weight Product by the Recombinant Enzyme. *Biochemistry*. 1994, vol. 33, issue 31, s. 9033-9039. DOI: 10.1021/bi00197a001.
- [37] HELDERMON, C., P. L. DEANGELIS a P. H. WEIGEL. Topological Organization of the Hyaluronan Synthase from *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Biological Chemistry*. 2001-01-19, vol. 276, issue 3, s. 2037-2046. DOI: 10.1074/jbc.M002276200. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M002276200>
- [38] KUMARI, K. a P. H. WEIGEL. Molecular Cloning, Expression, and Characterization of the Authentic Hyaluronan Synthase from Group C *Streptococcus equisimilis*. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, vol. 272, issue 51, s. 32539-32546. DOI: 10.1074/jbc.272.51.32539.
- [39] WEIGEL, P. H. a B. A. BAGGENSTOSS. Hyaluronan synthase polymerizing activity and control of product size are discrete enzyme functions that can be uncoupled by mutagenesis of conserved cysteines. *Glycobiology*. 2012-08-22, vol. 22, issue 10, s. 1302-1310. DOI: 10.1093/glycob/cws102. Dostupné z: <http://www.glycob.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/glycob/cws102>
- [40] TLAPAK-SIMMONS, V. L. Purification and Lipid Dependence of the Recombinant Hyaluronan Synthases from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equisimilis*. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, vol. 274, issue 7, s. 4239-4245. DOI: 10.1074/jbc.274.7.4239. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.274.7.4239>
- [41] KUMARI, K., B. A. BAGGENSTOSS, A. L. PARKER a P. H. WEIGEL. Mutation of Two Intramembrane Polar Residues Conserved within the Hyaluronan Synthase Family Alters Hyaluronan Product Size. *Journal of Biological Chemistry*. 2006-04-21, vol. 281, issue 17, s. 11755-11760. DOI: 10.1074/jbc.M600727200. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M600727200>
- [42] TLAPAK-SIMMONS, V. L., E. S. KEMPNER, B. A. BAGGENSTOSS a P. H. WEIGEL. The Active Streptococcal Hyaluronan Synthases (HASs) Contain a Single HAS Monomer and Multiple Cardiolipin Molecules. *Journal of Biological Chemistry*. 1998-10-02, vol. 273, issue 40, s. 26100-26109. DOI: 10.1074/jbc.273.40.26100. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.273.40.26100>

- [43] WEIGEL, Paul H. Hyaluronan Synthase: The Mechanism of Initiation at the Reducing End and a Pendulum Model for Polysaccharide Translocation to the Cell Exterior. *International Journal of Cell Biology* [online]. 2015, **2015**, 1-15 [cit. 2020-05-29]. DOI: 10.1155/2015/367579. ISSN 1687-8876. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/ijcb/2015/367579/>
- [44] WEIGEL, P. H., V. C. HASCALL a M. TAMMI. Hyaluronan Synthases. *Journal of Biological Chemistry*. 1997-05-30, vol. 272, issue 22, s. 13997-14000. DOI: 10.1074/jbc.272.22.13997. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.272.22.13997>
- [45] MEDINA, Andria P, Jialing LIN a Paul H WEIGEL. Hyaluronan synthase mediates dye translocation across liposomal membranes. *BMC Biochemistry*. 2012, vol. 13, issue 1. DOI: 10.1186/1471-2091-13-2.
- [46] WEIGEL, P. H. a B. A. BAGGENSTOSS. Hyaluronan synthase polymerizing activity and control of product size are discrete enzyme functions that can be uncoupled by mutagenesis of conserved cysteines. *Glycobiology* [online]. 2012, **22**(10), 1302-1310 [cit. 2020-05-29]. DOI: 10.1093/glycob/cws102. ISSN 0959-6658. Dostupné z: <https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/cws102>
- [47] *ApE - A plasmid Editor* [online]. University of Utah Biology Department [cit. 2019-03-31]. Dostupné z: <http://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/apc/>
- [48] *National Center for Biotechnology Information: Basic Local Alignment Search Tool* [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: U.S. National Library of Medicine, 2018 [cit. 2018-07-01]. Dostupné z: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [49] DARLING, A. C.E. Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. *Genome Research* [online]. 2004, **14**(7), 1394-1403 [cit. 2020-05-26]. DOI: 10.1101/gr.2289704. ISSN 1088-9051. Dostupné z: <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.2289704>
- [50] MA, Z., J. GENG, H. ZHANG, et al. Complete Genome Sequence of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* Strain ATCC 35246. *Journal of Bacteriology* [online]. 2011, **193**(19), 5583-5584 [cit. 2020-02-18]. DOI: 10.1128/JB.05700-11. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.05700-11>
- [51] VAN DIJK, Erwin L., Yan JASZCZY SZYN a Claude THERMES. Library preparation methods for next-generation sequencing: Tone down the bias. *Experimental Cell Research* [online]. 2014, **322**(1), 12-20 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.01.008. ISSN 00144827. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482714000160>
- [52] *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 35246, complete sequence: The annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP). NCBI [online]. NCBI RefSeq, 2020, 2 February 2020 [cit. 2020-06-09]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_017582.1?report=genbank&to=2167264
- [53] AMEND, ANTHONY S., KEITH A. SEIFERT a THOMAS D. BRUNS. Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* [online]. 2010, **19**(24), 5555-5565 [cit. 2020-05-29]. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04898.x. ISSN 09621083. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-294X.2010.04898.x>
- [54] GARZETTI, Debora, Sandrine BRUGIROUX, Boyke BUNK, Rüdiger PUKALL, Kathy D. MCCOY, Andrew J. MACPHERSON a Bärbel STECHER. High-Quality Whole-Genome Sequences of the Oligo-Mouse-Microbiota Bacterial Community. *Genome Announcements* [online]. 2017, **5**(42), e00758-17 [cit. 2020-06-08]. DOI: 10.1128/genomeA.00758-17. ISSN 2169-8287. Dostupné z: <https://MRA.asm.org/content/5/42/e00758-17>
- [55] ANGOV, Evelina. Codon usage: Nature's roadmap to expression and folding of proteins. *Biotechnology Journal* [online]. 2011, **6**(6), 650-659 [cit. 2020-05-25]. DOI: 10.1002/biot.201000332. ISSN 18606768. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.201000332>
- [56] VIMR, Eric R., Kathryn A. KALIVODA, Eric L. DESZO a Susan M. STEENBERGEN. Diversity of Microbial Sialic Acid Metabolism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2004, **68**(1), 132-153 [cit. 2020-06-08]. DOI: 10.1128/MMBR.68.1.132-153.2004. ISSN 1092-2172. Dostupné z: <https://MMBR.asm.org/content/68/1/132>

- [57] SEVERI, Emmanuele, Derek W. HOOD a Gavin H. THOMAS. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology* [online]. 2007, **153**(9), 2817-2822 [cit. 2020-06-08]. DOI: 10.1099/mic.0.2007/009480-0. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2007/009480-0>
- [58] AFZAL, Muhammad, Sulman SHAFEEQ, Hifza AHMED, Oscar P. KUIPERS a M. KIVISAAR. Sialic Acid-Mediated Gene Expression in *Streptococcus pneumoniae* and Role of NanR as a Transcriptional Activator of the nan Gene Cluster. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2015, **81**(9), 3121-3131 [cit. 2020-06-08]. DOI: 10.1128/AEM.00499-15. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.00499-15>
- [59] MITCHELL, A.M. a T.J. MITCHELL. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2010, **16**(5), 411-418 [cit. 2020-05-11]. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03183.x. ISSN 1198743X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14633115>
- [60] TOMOYASU, Toshifumi, Atsushi TABATA, Hidenori IMAKI, Keigo TSURUNO, Aya MIYAZAKI, Kenji SONOMOTO, Robert Alan WHILEY a Hideaki NAGAMUNE. Role of *Streptococcus intermedius* DnaK chaperone system in stress tolerance and pathogenicity. *Cell Stress and Chaperones* [online]. 2012, **17**(1), 41-55 [cit. 2020-06-03]. DOI: 10.1007/s12192-011-0284-4. ISSN 1355-8145. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12192-011-0284-4>
- [61] *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: KEGG* [online]. [cit. 2020-05-26]. Dostupné z: <https://www.kegg.jp/kegg/kegg2.html>
- [62] JIANG, Yong-Liang, Wei-Li YU, Jun-Wei ZHANG, Cecile FROLET, Anne-Marie DI GUILMI, Cong-Zhao ZHOU, Thierry VERNET a Yuxing CHEN. Structural Basis for the Substrate Specificity of a Novel β -N-Acetylhexosaminidase StrH Protein from *Streptococcus pneumoniae* R6. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2011, **286**(50), 43004-43012 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1074/jbc.M111.256578. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M111.256578>
- [63] MENGIN-LECREULX, D a J VAN HEIJENOORT. Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase activities of *Escherichia coli*: characterization of the glmU gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *Journal of Bacteriology* [online]. 1994, **176**(18), 5788-5795 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1128/JB.176.18.5788-5795.1994. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://JB.asm.org/content/176/18/5788>
- [64] LIVAK, Kenneth J. a Thomas D. SCHMITTGEN. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* [online]. 2001, **25**(4), 402-408 [cit. 2020-05-26]. DOI: 10.1006/meth.2001.1262. ISSN 10462023. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629>
- [65] GINSBURG, Isaac. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. 2002, **2**(3), 171-179 [cit. 2020-05-25]. DOI: 10.1016/S1473-3099(02)00226-8. ISSN 14733099. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309902002268>

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HA – hyaluronová kyseliny / Hyaluronic Acid

GlcUA – D-glukuronová kyselina

GlcNAc – N-acetylglukosamin

UTP – uridin trifosfát

UDP – uridin difosfát

ATP – adenosin trifosfát

HAS – hyaluronan syntáza

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

DNA – deoxyribonukleová kyselina

qPCR – polymerázová řetězcová reakce v reálném čase / real-time PCR

bp – páry bází / base pair

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

NCBI – National Center for Biotechnology Information

WGS – celogenomová sekvenace / Whole Genome Sequencing

NGS – sekvenace nové generace / New Generation Sequencing

dNTP – deoxyribonukleotid trifosfát

SNV – bodová mutace / Single Nucleotide Variant

CDS – kódující sekvence / CoDing Sequence

KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LTA – kyselina lipoteichoová

AMK – aminokyselina / aminokyselinový

7 STRUČNÝ ŽIVOTOPIS AUTORA

Osobní informace

Jméno: Radka Hrudíková
Trvalé bydliště: Sokolská 439, Holešov 769 01
Datum narození: 30.01.1988

Vzdělání

2012 – současnost Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, program Fyzikální chemie, obor Fyzikální chemie
2010 – 2012 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, program Chemie a technologie potravin, obor Potravinářská chemie a biotechnologie, dosažený titul Ing., téma diplomové práce: Využití magnetických mikročástic pro izolaci bakteriální DNA
2007 – 2010 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, program Chemie a technologie potravin, obor Biotechnologie, dosažený titul Bc., téma bakalářské práce: Mikrofauna aktivovaného kalu biologických čistíren odpadních vod na Kroměřížsku
2003 – 2007 Gymnázium L. Jaroše v Holešově, maturitní zkouška: Český jazyk, Anglický jazyk, Chemie, Biologie

Pracovní zkušenosti

8/2012 – 7/2013 Biotechnologická a farmaceutická společnost Contipro a.s., odborný pracovník v laboratoři
8/2014 – 2/2016 Biotechnologická a farmaceutická společnost Contipro a.s., odborný pracovník v laboratoři
1/2013 – 6/2013 Mendelova univerzita v Brně, Ústav chemie a biochemie, externí lektor
6/2016 – souč. AVČR, Ústav molekulární genetiky, výzkumný pracovník ve skupině buněčné motility

Zahraniční stáž

8/2013 – 6/2014 Norwegian University of Science and Technology (NTNU), Department of Biotechnology, Trondheim, Norway, Aim of work: New insights into Pseudomonas fluorescens alginate biosynthesis relevant for the establishment of an efficient production process for microbial alginates

Pedagogická činnost

1/2013 – 6/2013 Mendelova univerzita v Brně, Ústav chemie a biochemie, externí lektor pro praktikum z biochemie

8 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

– KONFERENCE

HRUDÍKOVÁ, R. PEPELIAEV, S. *Determination of the reference genes in Streptococcus equi subsp. zooepidemicus for real- time PCR*. CEITEC PhD Retreat, Book of Abstracts. Brno: Masaryk University, 2015. s. 49-49. ISBN: 978-80-210-7825- 3.

HRUDÍKOVÁ, R. PEPELIAEV, S. VELEBNÝ, V. *Determination of the Reference Genes in Streptococcus equi subsp. zooepidemicus for Real- Time PCR*. Sborník abstraktů. 1. Brno: Vysoké Učení Technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, Brno 61200, 2015. s. 65-65. ISBN: 978-80-214-5290- 9.

PAPRSKÁŘOVÁ A.; **HRUDÍKOVÁ, R.**; ŠVADLÁK D.; ZÁPOTOCKÝ V.; VELEBNÝ V.; SUCHÝ. *Susceptibility of selected antibiotics, used individually and in their combinations, to the most common causative agents of nosocomial infections, in cardiovascular surgery*. Sborník abstraktů, 65. česko- slovenské farmakologické dny. Praha: Farmakologický ústav 1. LF UK a VFN v Praze, 2015. s. 35-35. ISBN: 978-80-260-8027- 5. <http://www.quickcomp.cz/Conference/files/Sbornik.pdf>

– MEZINÁRODNÍ KONFERENCE A KONGRESY

PEPELIAEV, S. JILKOVA, J. **HRUDIKOVA, R.** SMIRNOU, D. FRANKE, L. *Mutant hyaluronan lyase sphyl lacking α - domain possesses catalytic activity*. Proceedings of the 11th International Conference on Polysaccharides- Glycoscience. 1. Prague, Czech Republic: Czech Chemical Society, Prague, 2015. s. 147-150. ISBN: 978-80-86238-85-2. ISSN: 2336- 6796.

MALEKI, S. MÆRK, M. **HRUDIKOVA, R.** VALLA, S. ERTESVÅG, H. *In pseudomonas fluorescens alginate production levels are, determined by the available fructose 6- phosphate*. Book of Abstracts. 1. Řím: SAPIENZA universita di Roma, 2015.

ŠTĚPÁNKOVÁ, Veronika, Daniel ŠVADLÁK, **Radka HRUDÍKOVÁ**, Alice PAPRSKÁŘOVÁ, Vojtěch ZÁPOTOCKÝ a Vladimír VELEBNÝ. The minimal inhibition concentration obtained by E-test as a criterion for selection of mutual combination of antimicrobial agents. *New Biotechnology*. 2016, **33**, S80-. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.06.994. ISSN 18716784. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678416317770>

FRANKE, Lukáš, Dzianis SMIRNOU, Stanislav PEPELIAEV, Zbyněk ČERNÝ, **Radka HRUDÍKOVÁ** a Vladimír VELEBNÝ. N-Acetylglucosamine as a signalling molecule triggering hyaluronic acid increase in Streptococcus zooepidemicus. *New Biotechnology*. 2016, **33**, S152-. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.06.1248. ISSN 18716784. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678416320313>

– IMPAKTOVANÉ ČLÁNKY

PEPELIAEV, Stanislav, **Radka HRUDÍKOVÁ**, Jana JÍLKOVÁ, Jaroslav PAVLÍK, Dzianis SMIRNOU, Zbyněk ČERNÝ a Lukáš FRANKE. Colorimetric enzyme-coupled assay for hyaluronic acid determination in complex samples. *European Polymer Journal* [online]. 2017, **94**, 460-470 [cit. 2018-07-02]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2017.07.036. ISSN 00143057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305717300551>

MALEKI, Susan, Mali MÆRK, **Radka HRUDIKOVA**, Svein VALLA a Helga ERTESVÅG. New insights into Pseudomonas fluorescens alginate biosynthesis relevant for the establishment of an efficient production process for microbial alginates. *New Biotechnology*. 2016, DOI: 10.1016/j.nbt.2016.08.005. ISSN 18716784. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678416323925>

– PATENTY

CONTIPRO A.S. *Method of determination of hyaluronic acid*. Inventors: PEPELIAEV Stanislav, **HRUDIKOVA Radka**, JILKOVA Jana, PAVLIK Jaroslav, VELEBNY Vladimir. Czech Republic. Application number: WO2018166545A1. Date of application: 2018-09-20. online: https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=20180920&DB=EPODOC&locale=en_EP&CC=WO&NR=2018166545A1&KC=A1&ND=5#