

## **Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Jana Blumensteina nazvanou „Překryvy regulonů stresových sigma faktorů RNA polymerázy korynebakterií a rhodokoků“**

Disertační práce se zabývá regulací promotorů u tří druhů bakterií, a to *Corynebacterium glutamicum*, *Rhodococcus erythropolis* a *Rhodococcus opacus*.

Úvod má 19 stran a je pečlivě zpracován. Poskytuje detailní informace o studovaných bakteriích, vysvětluje jejich průmyslové využití a shrnuje současné znalosti o  $\sigma$  faktorech u korynebakterií a rhodokoků.

V části Materiál a metody je popsáno klonování, mutageneze, transformace do *E. coli* a *C. glutamicum*, měření fluorescence v bezbuněčném extraktu *C. glutamicum* a *in vitro* transkripce. Chyběl mi popis počítačového modelování a simulací molekulární dynamiky (jaký software byl například použit), které jsou uvedeny v kapitole 5.1.1.3 výsledků. Chybí zde také popis izolace RNA, přípravy cDNA knihoven a analýzy sekvenačních dat, které jsou popisovány v podkapitole 5.2.3.1. Vše ostatní je popsáno velice podrobně.

Kapitola výsledků je detailně zpracována. V první části je měřena transkripce ze čtyř promotorů v přítomnosti  $\sigma^D$  a  $\sigma^H$  (včetně mutantních variant  $\sigma^H$ ) u *C. glutamicum*. Autorovi se podařilo vytvořit hybridní  $\sigma^D/\sigma^H$  promotor, který je rozpoznáván pouze mutantními variantami  $\sigma^H$ . V podkapitole 5.1.1.1. nebylo úplně zřejmé, zda se jedná o nové výsledky či dříve publikovaná data z laboratoře, v podkapitole 5.1.1.3 (počítačové modelování interakce mezi  $\sigma$  faktory a promotory) zase nebylo jasné, nakolik se autor na výsledcích podílel. V druhé části práce je ukázáno, jak jednotlivé záměny nukleotidů v promotoru rozpoznávaném  $\sigma^M$  u *C. glutamicum* vedou k tomu, že je promotor rozpoznáván i dalšími  $\sigma$  faktory. V třetí části výsledků se autor zabýval  $\sigma$  faktory u rhodokoků. Našel několik promotorů rozpoznávaných  $\sigma^D$ ,  $\sigma^H$  a  $\sigma^E$ , určil promotorové sekvence důležité pro konkrétní  $\sigma$  faktory a vše potvrdil pomocí *in vivo* dvoukomponentového systému a také pomocí *in vitro* transkripce. Kapitola výsledků přináší nové a zajímavé poznatky, jen bych některé části, které popisují klonování promotorů, restriční štěpení apod., zařadila spíše do kapitoly Materiál a metody.

Diskuze na téměř 30 stranách detailně vysvětluje a shrnuje získaná data a dává je do kontextu se současným stavem poznání, je vidět, že autor problematice rozumí a má rozsáhlé znalosti.

K předložené práci mám následující dotazy:

1. Počítačové modelování bylo prováděno na základě struktury  $\sigma^E$  z *E. coli*, jak se sekvence domény  $\sigma_4$  tohoto  $\sigma$  faktoru liší od  $\sigma^D$  a  $\sigma^H$  *C. glutamicum*? Pokud nejsou sekvence stejné, jak byly získány struktury  $\sigma^D$  a  $\sigma^H$  zobrazené na obrázcích 10 až 14?
2. Proč  $\sigma^M$  aktivuje  $\sigma^M$  dependentní promotor (*Pcg0668*) v dvoukomponentovém systému až ve stacionární fázi růstu? Je během exponenciální fáze  $\sigma^M$  z plazmidu exprimován, případně je  $\sigma^M$  stabilní? Existuje nějaké jiné vysvětlení, proč  $\sigma^M$  aktivuje transkripci až ve stacionární fázi?
3. *In vitro* transkripce byly prováděny s RNA polymerázou z *C. glutamicum* a  $\sigma$  faktory z *R. erythropolis*. Jak sekvenčně podobné jsou si RNA polymerázy z *R. erythropolis* a *C. glutamicum*? (RNA polymeráza z mykobakterií, které jsou rhodokokům blízké příbuzné, má například 100 aminokyselin navíc vložených do  $\beta$  podjednotky).
4. V některých grafech bylo patrné, že je promotor aktivován pouze přítomností plazmidu se  $\sigma$  faktorem, aniž by tento  $\sigma$  faktor byl indukován (např. *P1sigB* a  $\sigma^E$ , obrázek 27). V diskuzi bylo uvedeno, že to může být způsobeno částečnou expresí  $\sigma$  faktoru, ke které z plazmidu dochází i bez indukce, a vysokou citlivostí promotoru. U *P1sigBG-31* dochází k aktivaci promotoru, i když exprese  $\sigma^E$  není indukována, celková aktivita promotoru je však nižší oproti *P1sigB*, kde k aktivaci bez indukce exprese  $\sigma^E$  nedochází (700 versus 4000 AU). Znamená to, že je *P1sigBG-31* lépe rozpoznáván  $\sigma^E$ , ale přesto je transkripce z tohoto promotoru nižší?
5. Jaký protokol byl použit pro sekvenování primárních 5' konců transkriptů (kapitola 5.2.2 a obrázek 22)?

Práci přes uvedené připomínky **doporučuji k obhajobě.**

Jarmila Hnilicová

Katedra genetiky a mikrobiologie

Viničná 1965/5, 128 43 Praha, Česká republika