

Oponentský posudek

Název disertační práce:

Překryvy regulonů stresových sigma faktorů RNA polymerázy korynebakterií a rhodokoků

Autor: **Mgr. Jan Blumenstein**

Cílem předkládané disertační práce nazvané „Překryvy regulonů stresových sigma faktorů RNA polymerázy korynebakterií a rhodokoků“ bylo charakterizovat doposud nepopsané regulony stresových (ECF) sigma faktorů RNA polymerázy u vybraných zástupců rodu *Rhodococcus*: *R. erythropolis* a *R. opacus*. Dále porovnat získané výsledky s výsledky dříve získanými u příbuzné a lépe popsané bakterie *C. glutamicum*, čemuž předcházela analýza překryvů sigma regulonů u *C. glutamicum*.

Domnívám se, že po formální stránce je práce na velmi dobré úrovni. Text je srozumitelný, čtivý a obsahuje minimální množství překlepů. Obrázková dokumentace je standardní a vhodně doplňuje prezentovaná fakta. Struktura práce je členěna obvyklým způsobem. Obsahuje abstrakt, seznam zkratk, úvod, cíle práce, literární přehled, materiál a metody, výsledky, diskuzi a souhrn.

Literární úvod je velmi pěkně napsán. Je čtivý, z jazykového hlediska téměř bezchybný s minimem překlepů a slangových laboratorních výrazů, jejichž seznam uvádím níže. Pokud mohu soudit, tak literární úvod shrnuje stručně, ale výstižně současné poznatky řešeného tématu.

Z metodického hlediska je práce poměrně chudá, ale to je dáno řešenou problematikou. Použité metody jsou dostatečně vysvětleny.

Nejobsáhlejší část disertační práce tvoří kapitola Výsledky. Tato kapitola čítá celkem 55 stránek. Zde bych měl připomínku především ke kapitole 5.1.1.1. nazvané „Mutantní varianty faktoru σ^H *C. glutamicum*“, která je poměrně náročná na porozumění, což je do značné míry dáno řešenou problematikou. V tomto ohledu by možná stálo za to, popřemýšlet o jednodušší koncepci obrázků mutantních proteinových struktur, která se mi nezdála dostatečně přehledná. Převážná většina výsledku je však napsána srozumitelně a je logicky řazena. Některé obrázky jsou nižší kvality, což ovšem nesnižuje kvalitu výsledků. Zjištěné drobné nedostatky uvádím níže v seznamu připomínek.

Diskuze je obsáhlá a je prezentována na 29-ti stránkách. Opět je napsána srozumitelně a autor logicky diskutuje své výsledky a porovnává s dostupnou literaturou.

Práce obsahuje více než 200 citací a pokud mohu soudit, převážná většina jsou původní odborné práce.

Tato disertační práce, kterou autor vypracoval v dobře zavedené bakteriologické laboratoři v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Laboratoři modulace genové exprese pod vedením Ing. Miroslava Pátka, CSc., se zabývá velmi zajímavou a stále aktuální problematikou odhalení funkce sigma faktorů RNA polymerázy při regulaci genové exprese u biotechnologicky významných mikroorganismů - korynebakterií a rhodokoků. Originální výsledky nasbírané autorem byly publikovány ve dvou impaktovaných časopisech, z nichž u jedné z nich je Mgr. Jan Blumenstein prvním autorem publikace. Vytyčené cíle předkládané disertační práce považuji za splněné. Autor prokázal schopnost samostatné vědecké práce, a proto doporučuji předkládanou disertační práci k obhajobě.

Otázky a připomínky:

- 1) Např. na straně 92, obr. 28 B,C - v případě testování vlivu SigE faktoru na aktivitu příslušných promotorů mě překvapila vysoká aktivita promotorů u neindukovaných vzorků. V diskuzi pak uvádíte možné logické vysvětlení, že není vyloučená slabá exprese SigE i bez přidání induktoru IPTG. Přesto bych se rád zeptal, zda jste nezkoušeli či nezvažovali např. pomocí imunodetekce či MS analýzy zjistit hladinu SigE bez přidání IPTG ve vzorku? Máte ještě jiné možné vysvětlení pro zvýšenou aktivitu těchto promotorů? Jinými slovy, je možná přítomnost nějakého analogu IPTG v médiu, která by způsobila produkci SigE bez přidání IPTG?
- 2) Vzhledem k tomu, že faktor SigA je vegetativním σ faktorem, je esenciálním proteinem u bakterií. Umím si představit, že u některých mikroorganismů, které disponují vysokou genetickou plasticitou, např. *Streptococcus pneumoniae*, *B. subtilis* atd., by příprava delece v genu kódující sigA mohla být provedena a její letalita kompenzována akumulací supresorových mutací, které ovšem mohou být nápomocné při dalším studiu regulační dráhy spojené se sigma faktory. Lze v literatuře nějaké takové experimenty/data dohledat? Jak uvádíte na str. 16, oba faktory SigA a SigB jsou si podobné a rovněž jejich promotory jsou si podobné. Nebylo by možné, aby např. po případné deleci SigA převzal jeho vegetativní funkci SigB faktor, který by sám nesl supresorové mutace a tím kompenzoval letalitu delece genu sigA?
- 3) Z některých grafů (např. na str. 99, obr. 30 – především B, C, D, E) je patrné, že neindukované vzorky v čase 0 hod. mají vyšší intenzitu fluorescence než vzorky po následné inkubaci 3, 6 či 24 hod. bez indukce a dokonce v některých případech i po indukci IPTG. Máte pro to nějaké vysvětlení?
- 4) Aktivita promotorů je měřena jako intenzita fluorescenčního signálu reportérového genu *gfpUV* normalizovaná na celkové množství proteinu ve vzorku. Nebylo by vhodnější normalizovat intenzitu fluorescence na hladinu exprese samotného sigma faktoru?
- 5) Můžete blíže popsat zmíněný fenomén VBNC a porovnat jej s perzistencí u bakterií?

Laboratorní slang – primer (str. 32-39, 50 atd.), nadexprese a podexprese (str. 9, 10, 19, 24, 47, 83 atd.), osekvenovat (str. 8, 34, 110)

Str. 52, obr. 9 – u kmene 4AA_K + IPTG nekoresponduje barevná škála grafu s legendou

Str. 67, řádek 13 – chybí tečka za řadovou číslovkou: „Ve 3_ hodině po indukci...“

Str. 71, řádek 9 – kolonií místo koloniích

Str. 71, řádek 23 – sigH místo sigHR.e.

Str. 84, kapitola 5.2.3.3., řádek 3 – klonových místo klonovaných

Str. 119, řádek 19 – měřeních místo měření

V Praze, dne 26. 4. 2024

RNDr. Aleš Ulrych, Ph.D.