

## Oponentský posudek doktorské disertační práce Ing. Martiny Zemanové

„Charakterizace promotorů *Corynebacterium glutamicum* regulovaných zvýšenou teplotou.“

Cílem předložené práce je charakterizovat promotory *C. glutamicum* regulovaných zvýšenou teplotou. Autorka jednak charakterizovala promotory tří kódující proteiny podobné již známým teplotně adaptačním proteinům z jiných bakterií, tak se pokusila vyhledat nové teplotně regulované promotory. Při této snaze isolovala novou regulační nekódující RNA, tento typ regulačních molekul nebyl doposud u *C. glutamicum* popsán.

Tématika práce je vysoce aktuální jak z pohledu teoretické vědy, rozšiřuje znalosti o teplotně adaptačních mechanismech mikroorganismů, tak i průmyslového využití v konstrukci kmenů nadprodukcujících aminokyseliny. Cíle práce byly splněny a navíc autorka dosáhla zcela nového originálního výsledku v objevení doposud nepopsané ncRNA. Stanovením transkripčních počátků z jednotlivých promotorů objasnila mechanismy regulace z těchto promotorů.

Práce je rozsáhlá (147 stran), pečlivě sepsaná, obsahuje všechny předepsané kapitoly a formality. V teoretickém úvodu shrnuje autorka poznatky ze všech okruhů, které se týkají její práce tzn. charakterizace použitého kmenu, typy promotorů a jejich regulační funkce v gram pozitivních i gramnegativních mikroorganismech, popisuje i současné znalosti o regulačních nekódujících RNA, jejichž tematika vyplynula až v průběhu práce.

V metodické části, která je nejrozsáhlejší, jsou uvedeny všechny použité metody, kmeny, plazmidy, primery i chemikálie. V experimentální části autorka prokázala schopnosti zvládnout řadu molekulárně genetických i biochemických technik, zcela rutinně prováděla náročné techniky např. izolace RNA a stanovení transkripčních počátků metodou PEX. Ve vyhodnocování výsledků si vedla logicky a prokázala i schopnosti k teoretické bioinformatické práci při analýze sekvencí promotorů.

Práce obsahuje rozsáhlou diskusi, v které autorka shrnuje své výsledky a porovnává je s dosud známými fakty o regulaci teplotně závislých promotorů. Navrhuje na základě svých teoretických i experimentálních analýz i mechanismus regulace nekódující RNA, objevila, že tato RNA se při různých teplotách transkribuje ze dvou promotorů s rozdílně dlouhými transkripty, které zaujímají rozdílnou sekundární strukturu. Výsledky její práce jsou dobrým základem pro další kvalitní výzkum nových regulačních mechanismů teplotního šoku u *C. glutamicum*.

K práci mám nicméně několik technických připomínek a otázek na autorku.

1. Část práce je vytištěna více či méně nakřivo což snižuje formální dojem z práce. (např. str. 24-28, obsah, tab. 3.1,3.2 str.34-35).
2. Obr. 2.2 na str. 20 je prezentován nekvalitně (rozmazaný deformovaný), navíc bez výrazné informační důležitosti.
3. Na str. 26 není vysvětlena zkratka HN-S a RNA III.
4. Str. 45 informace o čistotě vzorku je nevypovídající, chybí údaj poměru  $A_{260}/A_{280}$ , který odpovídá čistému vzorku.
5. V kap. 3.2.8.3. není uvedena citace k užití metodě kvantifikace fluorescenčního reportéru, znamená to, že autorka tuto metodiku během práce sama vypracovala?
6. Při presentaci výsledků stanovení aktivity jednotlivých promotorů (tab.4,1 atd.) je uvedena v tabulce pouze aktivita promotorů při zvýšené teplotě a indukční faktor. Možná by bylo lepší uvést i hodnotu při standardní teplotě, místo uvádění srovnávacího grafu pouze z jedné nejvyšší hodnoty. Ne vždy je uvedena ze stejného časového odběru.

7. Při studiu promotorů integrovaných do chromosomu by mělo být zdůrazněno do jaké jeho části se fúze promotor- reportérový gen vkládá, do původního promotoru nebo do oblasti 3' konce ppc *C. glutamicum* genu kódovaného integrativním plasmidem? Tyto dvě možnosti se liší vlastností vzniklého mutanta.
8. V experimentální části ani v diskusi není alespoň malá analýza proč není GFP systém vhodný reportérový gen. Máte na to nějakou teorii?
9. V kapitole 4.1.5. shrnutí výsledků první části práce uvádíte, že při testování P-sigE v mnohokopiovém plasmidu došlo k 4 násobnému zvýšení aktivity, z jaké hodnoty vycházíte, v tab. 4.1 při čase odběru 60 min, uvádíte IF 13,6.
10. V učebnicích se uvádí, že regulace množství alternativního faktoru  $\sigma^{32}$  je regulována též vytvářením komplexu s DnaK. To už neplatí?
11. Zajímavý jev mi připadá alternativní mechanismus translace bez vedoucí sekvence na transkriptech některých genů *C. glutamicum*. Uvádíte citaci z roku 2003, nebylo v této problematice od té doby nic publikováno?

Připomínky v žádném případě nesnižují můj názor na kvalitu práce, v které autorka prokázala své schopnosti k samostatné vědecké práci, jak teoretické tak experimentální. Z obsahového i formálního hlediska je možné konstatovat, že předložená doktorská disertační práce Ing. Martiny Zemanové splňuje všechny požadavky, které jsou na takovou práci kladeny ve smyslu § 47, odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a čl. 23 Pravidel pro organizaci studia PŘF UK a doporučuji ji k obhajobě

V Praze dne 4.3. 2008

RNDr. Irena Lichá, CSc.  
Katedra genetiky a mikrobiologie,  
Přírodovědecká fakulta UK, Praha