

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Radoslava Šilara na téma:

Účast alternativních sigma faktorů RNA polymerasy při regulaci exprese genů *Corynebacterium glutamicum*

Předkládaná disertační práce Mgr. Radoslava Šilara na téma „Účast alternativních sigma faktorů RNA polymerasy při regulaci exprese genů *Corynebacterium glutamicum*“ se zabývá studiem regulací transkripce sigma faktory RNA polymerasy s extracytoplazmatickou funkcí (ECF) gram-pozitivní, aerobní bakterie *Corynebacterium glutamicum*, která je jednak významným producentem aminokyselin, ale též modelovým kmenem pro studium dalších patogenních kmenů této bakterie. Sigma faktory RNA polymerasy s extracytoplazmatickou funkcí (ECF) se uplatňují při adaptaci buňky na stresové podmínky vyvolané změnami ve vnějším prostředí. Toto téma je v laboratoři školitele studováno intenzivně řadu let a laboratoř je významná v této problematice i na světové úrovni.

V práci byla studována především regulace exprese genů kódujících nejvýznamnější ECF sigma faktor SigH a jeho anti-sigma faktor RshA přístupem *in vivo* pomocí promoter probe vektorů v divokém kmeni a delečních mutantech některých ze sedmi ECF sigma faktorů kódovaných v genomu *Corynebacterium glutamicum*. Dále byly stanoveny geny patřící k regulonu SigH metodou microarrays a stanoven transkripční počátek vybraných, nově objevených SigH závislých genů metodou primer extension. Výsledky jsou potvrzeny experimenty využívající transkripci *in vitro*.

Práce je předkládána v plné verzi a opírá se zejména o dvě autorovy publikace, na kterých je druhým a prvním spoluautorem. Dosáhl několika výsledků posouvající poznání o regulaci transkripce u tohoto modelového organismu.

Transkripční analýzou operonu *sigH-rshA* byly identifikovány čtyři vegetativní promotory genu *sigH* a jeden SigH-dependentní promotor genu *rshA*. Metodou DNA Microarrays byly porovnány transkripční profily tohoto delečního kmene s divokým kmenem. 83 genů u delečního kmene, vykázalo zvýšenou míru transkripce v porovnání s divokým kmenem a většina byla též nalezena předchozím experimentem s vyřazeným genem *sigH*. Což prokazuje na účast komplexu SigH-RshA na regulaci exprese genů operonu. Tyto geny se účastní buněčné odpovědi na disulfidový stres, tepelný šok, buněčné SOS odpovědi při poškození DNA nebo jsou součástí buněčného proteasomu. Byly stanoveny promotorové aktivity vybraných nově identifikovaných SigH-dependentních genů (*dnaJ2*, *uvrA* a *uvrD*), identifikovány jejich transkripční počátky a následně odvozeny promotorové motivy -10 a -35.

Použitím *in-vitro* transkripčního systému bylo u SigH-dependentních promotorů genů *clgR*, *dnaK* a *dnaJ2* zjištěno, že jsou specificky rozeznávány též ECF sigma faktorem SigE. Bylo tak

poprvé u *C. glutamicum* prokázáno, že jeden promotor může být současně rozeznáván více než jedním sigma faktorem.

Práce obsahuje všechny kapitoly předepsané pro tento typ práce a splňuje všechny formální požadavky na tuto práci kladenou. V úvodu podává autor přehled přes celou problematiku od charakteristiky regulace transkripce až po popis použitých hlavních metod, microarrays a *in vitro* transkripci. Úvod mi přijde jako nejslabší část celé práce, je to spíše přehled obecných znalostí o sigma faktorech, stresových odpovědích a použitých metodikách. Zvláště v části o sigma faktorech bych očekávala podrobnější rešerši. Autor stále opakuje obecné informace v úvodu jednotlivých kapitol, jakoby text byl psán odděleně a neměl informační návaznost a gradaci. Dále je zarážející, že rešerše obsahuje minimum odkazů z posledních pěti let. Např. regulace tepelného šoku je zcela zastaralá s odkazem na práci z roku 2006 a není uvedena ani zmínka, jaké sigma faktory by mohly regulovat geny zodpovědné za tepelnou adaptaci – copak se tato problematika již nestuduje a nejsou novější publikace?

Kapitola materiál obsahuje všechny použité metody, které jsou popsány srozumitelně, ale možná zbytečně podrobně s ohledem na typ práce, např. obrázky genetických map komerčně dodávaných plazmidů.

Výsledky jsou popsány v logickém sledu, jak pravděpodobně byly v průběhu práce prováděny a postupně publikovány, jsou vysvětleny i cíle prováděných experimentů, jsou komentovány výsledky. Jediné, co asi zasloužilo vysvětlení již v kapitole 4.2.1, je jak byl predigován promotor pro gen pro antisigma faktor *rshA*, který leží bezprostředně za genem *sigH*. Dokumentace výsledků je provedena jednak převzetím obrázků a grafů z příslušných publikací, jednak jsou pravděpodobně nově vytvořeny pro disertaci. Převzatý obrázek 4.22 je ale ve špatné reprodukční kvalitě oproti originálům a nově vytvořené obrázky bych očekávala v jednotné grafické úpravě, což není a např. v obrázcích 4.7 a 4.15 - silné sloupce nepůsobí dobře ve srovnání s ostatními grafy. Text dále obsahuje několik překlepů a chyb ve formátování (např. str. 120). Práce je napsána vcelku dobrým jazykem a čtivě.

Diskuze pak obsahuje shrnutí výsledků, autor výsledky diskutuje a porovnává s literaturou jako jednotlivé experimenty odděleně a podle mého mínění zcela nevyužil možnosti srovnat celkově výsledky ze všech prací najednou i když to byl asi těžké pro množství výsledků a neúplnosti informací a experimentálních dat od všech studovaných genů. Diskuse výsledků transkripčních aktivit z promotorů genu *sigH* je nedostatečná a nebere v úvahu všechny uváděné výsledky, ne u všech *sigH* dependentních genů při studiích *in vivo* jsou uvedeny všechny stresové podmínky a všechny kombinace delečních mutant, nebyly provedeny příslušné experimenty nebo byly provedeny někým jiným z pracovní skupiny? V diskuzi ani v závěru nejsou uvedeny žádné hypotézy a návrhy dalších experimentů, autor ani případně neuvádí své výsledky do kontextu ostatních prací ve vlastní laboratoři.

Celkově práci i přes připomínky hodnotím kladně, autor provedl řadu hodnotných experimentů a systematické práce a vzhledem k pořadí v seznamu autorů na uvedených

publikacích bezesporu prokázal, že je schopen vědecké práce. Jeho výsledky jsou bezesporu přínosem pro další studium problematiky. Práci doporučuji k obhajobě jako podklad pro udělení vědecké hodnosti PhD.

Připomínky:

- V literárním úvodu je nejednotné používání výrazu pro sigma faktor - sigma faktor x σ -faktor x σ^H
- Str 75 u citace Holatko et al. není uveden rok publikování.
- Proč u peroxidového a diulfidového stresu není uvedena charakteristika kmene s delecí genu *rshA*? Byla dělána někým jiným nebo dělána nebyla? Výsledek by byl určitě zajímavý.
- Str. 99 – píšete, že pro kmeny s delecí v genech *sigB* a *rshA* nebylo možné hodnoty statisticky vyhodnotit, ale jsou uváděny v grafu se směrodatnými odchylkami, které vypadají, takto prezentované, v pořádku a ukazují na zvýšení aktivity promotoru. V čem byla ta statistická nevyhodnotitelnost?
- Str. 101 obrázku 4,19 došlo zde k nějaké grafické chybě? Rozsah sekvence neodpovídá vymezenému úseku.
- str.117 ve větě: „Rozeznávání promotoru *P4sigH* primárním sigma faktorem SigH bylo prokázáno metodou transkripce *in-vitro*“. Došlo k faktické chybě nebo překlepu? Opravdu je, SigH primární sigma faktor a váže se na *P4sigH*? Ve výsledcích deklaruje, že SigH se na *P4sigH* nevázal.
- Ve své práci při *in vitro* studiích interpretuje vznik nebo absence transkriptu, jako fakt, že se sigma faktor na promotorovou oblast váže, či neváže, nemělo by ale být spíše, že je aktivována transkripce z promotoru, či že transkripce proběhla? Sigma faktor se přece může vázat, ale transkripce nemusí proběhnout.
- V popisech obrázků deklaruje (např. obr. 4.7), že hodnoty v grafech jsou „aritmetické průměry ze čtyř/tří nezávislých měření jednotlivých vzorků“, Byly to 4/3 měření z jednoho biologického opakování nebo jste dělal měření ze 4/3 nezávislých kultivací, kolik jste pak měl technických opakování?

Otázky:

1. Z Vašich experimentů je patrné, že delece genu *rshA* zvýšila aktivitu transkripce u většiny SigH závislých genů– což může též indikovat součinnost produktů těchto genů. Je známo, jakým mechanismem, či na jaký impuls dochází k uvolnění SigH od RshA a naopak a jak je toto regulováno u jednotlivých stresů? Dělal již někdo tuto

studii u *Corynebacterium glutamicum* případně u *Mycobacterium* či *Streptomyces* u nichž byl nalezen homologní gen?

2. Str 111 - V práci Nakunst et al (2007) bylo experimentálně prokázáno (metodou RT-PCR?), že promotor *P_{trxB}* je SigM-dependenční. Vy jste prokázali metodou *in vitro* transkripce, že je naopak SigH a SigE dependenční. Jak se liší tyto dvě stanovení a jak si tento rozdíl vysvětlujete? Jak odůvodníte, že právě Vaše stanovení je správné, když nebyla provedena např. *in vivo* studie tohoto promotoru? Jaké další experimenty by to mohly prokázat?
3. Máte nějakou pracovní hypotézu, jaký význam mohou mít delší NTR oblasti v expresi genu *sigH*?
4. Z kterých promotorů *sigH* jsou transkribovány oba geny (*sigH* i *rshA*) do jedné mRNA?
5. Je u Korynebakterií prokázána koncentrační závislost na typu prvního nukleotidu v počátku transkripce na míru transkripce z tohoto promotoru?

V Praze 19. 8. 2016

RNDr. Irena Lichá, CSc.

Katedra genetiky a mikrobiologie,

Přírodovědecké fakulty UK, Praha