

**Posudek doktorandské disertační práce Mgr. Radoslava Šilara s názvem „Účast  
alternativních sigma faktorů RNA polymerasy při regulaci exprese genů  
*Corynebacterium glutamicum*“**

Předložená disertační práce **Mgr. Radoslava Šilara** splňuje po formální stránce všechna vyžadovaná kritéria. Autor zvolil klasickou formu disertace sestávající z literárního přehledu studované problematiky, přehledu materiálu a použitých metod a části výsledkové s následnou diskusí a závěrem. Po ediční stránce je disertace jako celek velmi pečlivě zpracována a graficky působí velmi přehledně. Překlepů a gramatických chyb je skutečně minimální počet, proto je ani nezmiňuji. K pochopení souvislostí pomáhá srozumitelný literární úvod shrnující řešenou problematiku. Diskuse k jednotlivým okruhům disertace poskytují čtenáři další možnost orientace. Rovněž autoreferát splňuje všechny požadované náležitosti a obsahuje i seznam publikací, jichž je doktorand autorem nebo spoluautorem. Výsledky experimentální práce dokazují, že doktorand zvládl pestrou škálu technik. Skutečnost, že většina výsledků již byla publikována ve významných časopisech je dostatečnou zárukou, že se jedná o originální data, jež prošla recenzním řízením.

Z hlediska odborného obsahu se autor v předložené práci zabýval regulací exprese genů kódujících sigma faktor SigH a jeho anti-sigma faktor RshA a genů patřících k jejich regulonu u *Corynebacterium glutamicum*.

Regulace transkripce sigma faktory RNA polymerasy s extracytoplasmatickou funkcí (ECF) představuje velmi účinný nástroj pro adaptaci buňky na stresové podmínky. V genomu *S. glutamicum* se nachází celkem 7 genů kódujících sigma faktory a SigH je považován za hlavní sigma faktor regulující iniciaci transkripce za stresových podmínek.

Těžiště práce, která je sepsána v českém jazyce, spočívá v analýze aktivity promotorových oblastí genů *sigH* a *rshA*, určení transkripčních počátků těchto genů a odvození příslušných promotorových oblastí. Mezi další cíle práce patřila identifikace a následná transkripční analýza genů regulovaných SigH. Pro tuto analýzu byly použity jak *in vivo* metody, a to pomocí reportérových systémů na bázi chloramfenikolacetyltransferasy (CAT) a zeleného

fluorescenčního proteinu (GFP), DNA microarray, *primer extension* pomocí metody 5' RACE tak *in vitro* transkripčního systému.

Lze konstatovat, že stanovením aktivit promotorových oblastí genů *sigH* a *rshA* byla u obou genů prokázána přítomnost aktivních promotorů reagujících na vnější stresové podmínky. U genu *sigH* byly identifikovány 4 promotory určeny dle sekvencí jako SigA-dependenní, u genu *rshA* 1 SigH-dependenní promotor.

Kromě toho byla pomocí transkripčního profilování delečního kmene  $\Delta rshA$  provedena identifikace několika desítek SigH-dependenních genů. U některých z těchto nově identifikovaných genů byly určeny aktivity promotorů, jejich transkripční počátky a následně odvozeny konsensus motivy.

Z výsledků získaných stanovením promotorových aktivit v kmenech s delecí v genech kódujících různé sigma faktory bylo možné usuzovat, že tyto promotory mohou být specificky rozeznávány více než jedním ECF sigma faktorem. K potvrzení tohoto předpokladu byl připraven *in vitro* transkripční systém, který tento předpoklad potvrdil. Kombinací *in vivo* a *in vitro* metod tak bylo poprvé prokázáno, že jeden promotor *C. glutamicum* může být rozeznáván dvěma rozdílnými sigma faktory.

K předložené disertaci mám pouze několik doplňujících dotazů:

- i) změny exprese genů u mutantu  $\Delta rshA$  ve srovnání s divokým typem jsou relativně nízké. Ověřoval je autor jinou metodou (např. qRT-PCR)?
- ii) během přípravy bezbuněčných lyzátů byl supernatant přenesen do zkumavek vysvícených UV zářením. Jednalo se o způsob sterilizace?
- iii) delece *sigE* má největší vliv na růst mutantu, dvojitou delecí *sigE* a *sigH* se nepodařilo připravit, z čehož autor usuzuje, že je letální. Lze na základě známých skutečností, tj. znalosti funkce genů, jež jsou kontrolovány těmito TF, které z nich jsou za pozorovaný genotyp odpovědný?
- iv) lze zcela vyloučit vznik artefaktů při transkripci *in vitro*? Nepodařilo se např. prokázat vazbu žádného sigma faktoru na promotor P3*dnaJ2*. Lze tuto skutečnost vysvětlit i jinak?
- v) Prosím autora o podrobnější diskuzi významu regulace promotoru vícero sigma faktory.

Autor bezesporu splnil vytyčené cíle práce a nepochybně odvedl mnoho časově náročné experimentální práce. V diskusi pak předvedl schopnost získané výsledky uvést do souvislostí. Podíl autora na dosažených výsledcích považuji za stěžejní, dostatečně dokumentovaný autorstvím a spoluautorstvím přiložených publikací.

Konstatuji, že úroveň předložené práce je velmi vysoká. Domnívám se, že předkládaná práce **Mgr. Radoslava Šilara** splňuje veškeré požadavky kladené na doktorské disertační práce ve smyslu § 47, odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a čl. 23 Pravidel pro organizaci studia PřF UK a proto ji doporučuji k obhajobě. V případě úspěšné obhajoby pak navrhuji, aby byl dle příslušných předpisů **Mgr. Radoslavu Šilarovi** udělen titul PhD.

V Praze 26.8.2016

RNDr. Pavel Branny, CSc.

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.