

Těžištěm předkládané práce je analýza proteinu SIGIRR, z rodiny IL-1R. Tento poměrně široce exprimovaný protein je negativním regulátorem dalších členů této rodiny a také receptorů z rodiny TLR. Tato práce se zabývá některými dosud nevyjasněnými aspekty expresního profilu, lokalizace a funkce tohoto proteinu.

V úvodu své práce autorka podává velmi zdařilý a vyvážený **přehled literatury**, který obsahuje všechny informace potřebné k pochopení a porozumění výsledkové části. **Metodická část** je napsána dostatečně podrobně a až na výjimky kompletně pokrývá procedury použité ve výsledkové části. Ocenit je třeba i široký metodický záběr této práce. V úvodu **výsledkové části** autorka popisuje přípravu expresních konstruktů proteinu SIGIRR, které pak v další části používá pro analýzu efektů zvýšené exprese tohoto proteinu v různých buněčných liniích. Poněkud překvapivě overexprese tohoto proteinu nevedla k inhibici signalizace přes TLR4 v reportérové B-buněčné linii 70Z/3 ani v linii J774 myeloidního původu, zatímco analýza peritoneálních makrofágů z myši s inaktivovaným genem pro SIGIRR inhibiční funkci tohoto proteinu spíše potvrzovala. V dalších kapitolách výsledkové části autorka popisuje výsledky analýzy subcelulární lokalizace a molekulárních forem proteinu SIGIRR a popisuje přípravu buněčné linie vhodné k pokusům o identifikaci ligandu tohoto proteinu. Závěrečné kapitoly se pak věnují analýze fertility SIGIRR deficientních myši a analýze embryí a embryonálních buněk z těchto zvířat. Interpretace dat je ve většině případů správná. Na několika místech však práce dospívá i k závěrům, které jsou nedostatečně experimentálně podloženy nebo jsou značně spekulativního charakteru (konkrétní připomínky se nacházejí v závěru tohoto posudku). **Diskuse** je zpracována kvalitně a v odpovídajícím rozsahu.

Po formální stránce je práce uspokojivě zpracována, kvalita i množství obrázků a tabulek je postačující pro správné pochopení a zhodnocení, i když je třeba říci že některé méně kvalitní obrázky a tabulky přejaté z jiných zdrojů, které se nacházejí v literárním úvodu jsou na hranici čitelnosti. Použitá literatura je v dostatečné míře a správně citována. Práce je psána slušnou angličtinou a množství překlepů a gramatických chyb je v akceptovatelných mezích.

Celkově lze říci, že Zdeňka Hanusová prokázala jak schopnost samostatné práce s vědeckou literaturou a teoretické zvládnutí zpracované problematiky, tak i širokou metodickou vybavenost, a schopnost analýzy komplexních experimentálních dat. I přes některé kritické připomínky, které mám k výsledkové části se domnívám, že práce splňuje požadavky na diplomovou práci a doporučuji ji ke kladnému přijetí.

Kritické připomínky a otázky do diskuse:

1. V legendě k obrázku 4.5 píšete, že exprese povrchového IgM v buněčné linii 70Z/3 byla stanovena pomocí protilátky proti IgG. Jaké izotypy imunoglobulinů byla zmíněná protilátka schopna detegovat?

2. U transfektantů J774 byly po aktivaci pomocí LPS pozorovány značné rozdíly v produkci TNF mezi liniemi transfekovanými různými konstrukty obsahujícími nebo neobsahujícími SIGIRR. Tyto rozdíly se zdály být nezávislé na typu vneseného konstruktů. Aby bylo tyto výsledky možné nějak interpretovat, bylo by potřeba tuto analýzu provést pro každý konstrukt na několika nezávislých liniích. Jinak nelze s jistotou říci, zda SIGIRR inhibuje nebo neinhibuje signalizaci TLR4.
3. Experiment s aktivací peritoneálních makrofágů ze SIGIRR^{-/-} myší byl proveden pouze jednou, takže na jeho základě nelze uskutečnit žádné jednoznačné závěry. Přesto výsledky ukazující zvýšenou expresi IL1 β a IL-6 působí poměrně věrohodně. V experimentu je pozorováno zvýšení jak bazální tak i LPS indukované exprese těchto cytokinů SIGIRR^{-/-} makrofágy. To je interpretováno jako efekt pouze na bazální produkci cytokinů nezávislou na LPS a signalizaci přes TLR4. Dle mého názoru nelze vyloučit přítomnost velmi malého množství LPS či jiných prozánětlivých komponent v kultuře těchto makrofágů (LPS je například běžnou kontaminací fetálního séra), které mohou být zodpovědné za tzv. bazální produkci cytokinů těmito makrofágy. Myslím, že autorčina interpretace je v tomto bodě velmi spekulativní.
4. Zajímavé je pozorování odlišných molekulových hmotností proteinu SIGIRR v různých typech buněk a s použitím různých typů konstruktů. Autorka došla k závěru, že nízkomolekulární formy jsou exprimované v nehematopoetických buňkách, zatímco formy s vyšší molekulovou hmotností jsou v leukocytech. Nicméně na vzorku z myších ledvin je pozorovatelný SIGIRR o stejné molekulové hmotnosti jako v leukocytární linii J774, zatímco buňky HEK293T, které také pocházejí z ledvin obsahují SIGIRR o mnohem menší velikosti. Zkoušela jste někdy porovnávat přímo na jednom gelu molekulovou hmotnost konstruktů s C-koncovým HA tagem a bez HA-tagu? Je možné že C-koncový tag (HA nebo YFP) nějakým způsobem ovlivňuje funkčnost konstruktů (např. inaktivace spojená s agregací apod.)? Jaké argumenty můžete uvést pro to, že konstrukty použité pro overexpresní analýzu byly funkční?
5. Obr. 4.23 – zde mám podobnou připomínku jako v bodě 3. Experiment byl proveden pouze 1x, což značně snižuje jeho interpretovatelnost.