

**Interaktom N-terminální domény IL-1 $\alpha$** 

Předložená diplomová práce se zabývá charakterizací intracelulární funkce N-terminálního fragmentu významného cytokinu IL-1 $\alpha$ , pro který byla v poslední době redefinována funkce z čistě extracelulárního pleiotropního cytokinu na signalizační molekulu s duální funkcí, včetně intracelulární, kterou zbývá patřičně molekulárně charakterizovat. O to se ve své práci Denisa Dolečková snaží zkonstruováním rekombinantního vektoru pro expresi rekombinantního N-terminálního fragmentu IL-1 $\alpha$  fúzaného se zeleným fluorescenčním proteinem, jeho vnesením do buněk a následnou charakterizací intracelulární lokalizace pomocí fluorescenční mikroskopie. Autorce se podařilo nalézt podmínky, za nichž navodila jadernou lokalizaci N-terminálního fragmentu IL-1 $\alpha$ /GFP a kdy zároveň prokázala ko-lokalizaci tohoto proteinu v jádrech buněk s p53.

V *literárním přehledu* autorka na cca 20 stranách věnuje problematice duální role vybraných chemokinů, s důrazem na intrakrinní působení. V centru zájmu autorky jsou cytokiny z rodiny IL1 a zejména protein IL-1 $\alpha$ , jehož problematika je podána s vyčerpáním v podstatě všech dostupných literárních pramenů, z nichž velká část je z autorčiny domovské laboratoře. Tato část diplomové práce neobsahuje nadbytečné obecné informace, soustřeďuje se na podstatu problému, obsahuje aktuální relevantní zdroje. V textu mi na některých místech scházejí čárky, občas podnět, celkově je ale text poměrně čtivý a čtenáře dobře uvádí do řešené problematiky

- *Na straně 23 je uvedeno, že IL-1 $\alpha$  může být díky myristylaci kotven v plasmatické membráně. Jaká frakce IL-1 $\alpha$  je takto posttranslačně modifikována? Může být tímto způsobem v buňce (možná tkáňově specificky) imobilizována určitá frakce prekursoru i maturovaného proteinu, s možnými důsledky pro intracelulární funkci? Kde byste v buňce očekávala lokalizaci myristovaného IL-1 $\alpha$ ?*
- *Na straně 21 je zmíněno, že do nitra buňky se interleukin-1 $\alpha$  může dostat receptorem zprostředkovanou endocytózou a díky přítomnosti jaderného lokalizačního signálu v sekvenci receptoru je možná jaderná lokalizace celého komplexu. Jak si tento přenos topologicky představujete?*

Kapitola *materiál a metody* je přehledně uspořádaná a kvalitně zpracovaná, umožňuje pochopení a reprodukování experimentů. Kladem je popis metod jako protokolů, což umožní využít práci Denisy Dolečkové jako laboratorní manuál při pokračování a rozvíjení projektu.

- *V práci používáte dvě lidské buněčné linie, jednu nenádorovou fibroblastové povahy Mrc-5 a druhou nádorovou odvozenou od embryonálních ledvinných epitelálních buněk (HEK 293T). Co vás vedlo k výběru právě těchto linií pro studium intracelulární funkce N-terminálního fragmentu IL-1 $\alpha$ ?*
- *Jak jste rozhodla, na který konec N-terminálního fragmentu IL-1 $\alpha$  připojit GFP?*

*Výsledky* shrnují získaná data. Je zřejmé, že se autorce podařilo splnit cíle své diplomové práce, tedy připravit rekombinantní vektor pEGFP-C1/NTP, dále byl připraven vektor pro retrovirovou transdukcí těžko transfekovatelné buněčné kultury Mrc-5 (MigR1/NTP), který však v práci, zřejmě z časových důvodů již nebyl použit. *Nepokusili jste se zvýšit transfekční účinnost pomocí elektroporace, popř. nukleofekci pomocí přístroje Amaxa?* Připravený konstrukt byl použit pro transfekční experimenty a byla charakterizována lokalizace fúzního fluorescenčního proteinu. *Na obr. 4.3.1 je zachycena poměrně vysoká autofluorescence v netransfekovaných buňkách – je to dáno celkově slabou expresí rekombinantního proteinu, nebo abnormálně vysokou autofluorescencí buněčné linie Mrc-1?* Autorka dále provedla několik pilotních experimentů, v nichž se pokusila ovlivnit intracelulární lokalizaci N-terminálního fragmentu IL-1 $\alpha$  - výměnami médií, nebo prostřednictvím ozáření UV a aktivací proteinu p53. Pro poslední experimenty jsou uvedena ukázková mikroskopická data bez kvantifikace (např. pomocí mikroskopického cytometru), která bude nezbytná, pokud by se měla jistě zajímavá a prioritní data publikovat.

Celkově je možné hodnotit předloženou práci jako kvalitní a pečlivě vypracovaný příspěvek k poznání nové funkce N-terminálního fragmentu IL-1 $\alpha$ . Práci doporučuji k přijetí k obhajobě a ke kladnému hodnocení. Je zřejmé, že se autorce nepodařilo zrealizovat všechny plánované experimenty (využít připravený konstrukt MigR1/NTP, nebo kvantifikovat změny lokalizace studovaného fragmentu v závislosti na iradiaci UV a aktivaci p53), předložené výsledky jsou dobrým základem, na němž může vzniknout kvalitní publikace do diskuse o intracelulární funkci jistě důležité signalizační molekuly.