

Oponentský posudek na disertační práci MUDr. Michaely Buganové : Hemoprotein nitric oxide synthase in *Aplysia californica*.

Předložená disertační práce byla zpracována na Klinice dětského lékařství 1. LF UK v Praze, pod vedením prof. MUDr. P. Martáska, DrSc. Na vedení projektu se zčásti podílel prof. L. Moroz, Whitney Laboratory in Marineland, Florida, USA. Část prací byla provedena v laboratoři dr. C.S. Ramana (Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Univ. of Texas Medical School). Anglický text disertace má 100 stran a je doprovázen 33 obrázky, grafy, mikrofotografiemi a grafy. Příloha disertační práce obsahuje 7 publikovaných prací, ve kterých je dr. Buganová spoluautorem. Disertace je orientována do oblasti molekulární struktury a dalších charakteristik funkčně významných hemoproteinů. Jako experimentální model byl použit *Zej kalifornský* (*Aplysia californica*), který je často používán při studiu morfologických, funkčních a behaviorálních charakteristik pokročilých centrálních nervových systémů u bezobratlých.

Disertace je členěna do dvou základních kapitol. První kapitola je zaměřena na chemickou charakteristiku NOS u aplysie, proteinů spojených s jejím metabolismem a na korelace jejich vlastností se savčí NOS. Druhá kapitola je zaměřena na studium charakteristik šestého enzymu hemové syntetické dráhy koproporphyrinogenoxidázy (CPO). Klonovaná CPO byla pak použita k definování krystalové struktury lidské CPO. Každá z kapitol je tradičně členěna a obsahuje úvod do problematiky, podrobnou metodickou a výsledkovou část, diskusi a závěry..

První kapitola disertace, její výsledková část a přiložené publikace obsahují řadu prioritních pozorování, z nichž uvádím jen nejzávažnější. Ac NOS vykazuje stejné enzymatické charakteristiky jako konstitutivní savčí a hmyzí NOS a je závislá na koncentraci intracelulárního Ca^{2+} .

Aktivita AcNOS je nižší (cca 6x) než aktivita savčí NOS.

Neurony exprimující NOS mRNA byly prokázány ve všech gangliích aplysie i když s rozdílnou densitou, ale v poměrně konstatní lokalizaci. Většina NOS – pozitivních neuronů je v cerebrálních gangliích, následovaných bukálními, pedálními, abdominálními a

pleurálními ganglii. Podobně jako u savců NOS pozitivita prokazovaná imunocytochemicky a pomocí histochemické reakce na NADPH-d v zásadě koreluje.

Po poranění pedálního nervu dochází k významnému poklesu nNOS mRNA a k poklesu neuronální positivity v neuronech pedálního ganglia počínaje třetím dnem po poranění na straně léze. Současně dochází ke zvýšení nNOS mRNA v axoplasmě vláken pedálního nervu.

Autorka a její spolupracovníci získali nové údaje o distribuci sensorin- A pozitivních neuronů (neuronů exprimujících sensorin A mRNA) v centrálních gangliích aplysie. Tyto neurony představují 5 – 10 % všech neuronů v centrálních gangliích a z funkčního hlediska se řadí k neuronům mechanoreceptorů. Jejich receptivní pole pokrývají celý povrch těla aplysie. Prioritním pozorováním je průkaz sensorin - A pozitivních neuronů v několika centrálních gangliích aplysie a jejich somatotopické uspořádání ve ventrokaudální skupině neuronů uložených v pleurálním gangliu. Byla prokázána cephalizace receptivních polí s vyšší hustotou a zároveň menší plochou receptivních polí hlavové oblasti.

Průkazem somatotopické organizace neuronů v pleurálním gangliu aplysie (sensorický aplunculus) tak autorka se svými spolupracovníky potvrdila universální platnost principu somatotopické reprezentace, pro který byly až dosud snášeny doklady při studiu CNS savců a nervového systému arthropod.

Další prioritní pozorování zaměřená na detaily somatotopické reprezentace povrchu těla aplysie jsou uvedena v práci Valterse, Bodnárové a spol. (2004).

Autorka dále přispěla k objasnění funkce sensorin-A pozitivních neuronů. Tyto neurony mají vysoký práh na mechanickou stimulaci, odpovídají převážně na silné podněty a jejich funkce je vs. nociceptivní. Tento názor je podporován skutečností, že jejich projekce mají excitační charakter a směřují k motoneuronům, které, které vyvolávají generalizovanou pohybovou aktivitu aplysie a které tedy mají obranné funkce.

Dalším významným nálezem je průkaz a klonování enzymu, který se podílí na syntese thyroideálních hormonů (thyroid peroxidasa), které u aplysie participují na metamorfoze a energetickém metabolismu.

Ve druhé kapitole jsou shrnuty výsledky zaměřené na klonování genu coproporphyrinogen oxidasy (CPO) a byla prostudována lokalizace neuronů pozitivních na mRNA tohoto enzymu v centrálních gangliích Aplysie. Klonovaná CPO z Aplysie a z dalších organismů byla použita k definování krystalové struktury lidské CPO. Poznání krystalové struktury CPO bylo využito k poznání katalytických vlastností enzymu.

Autorka disertace se podílela na několika studiích zpracovaných zcela odlišnými technikami molekulární biologie. Kromě genetické analýzy je to in situ hybridizace, histochemický a imunocytochemický průkaz enzymů a peptidů, klonování NOS, intracelulární aplikace fluorescenčních markerů, western blot a mnoho dalších. Autorka prokázala detailní znalosti nejen při používání těchto technik, ale i při interpretaci dosažených výsledků.

Výsledky, kterých dosáhla se svými spolupracovníky jsou shrnuty do 7 časopiseckých publikací (1 publikace je v tisku). IF časopisů je v rozmezí 1.78 – 10.23 a publikované práce byly až dosud citovány 36 x. Svoje výsledky autorka prezentovala formou posterů i na několika mezinárodních kongresech, jejich seznam však postrádám.

K práci nemám žádné závažné připomínky, v textu je pouze několik překlepů, ale mám několik dotazů :

Jsou NOS pozitivní vlákna v interganglionárních svazcích, propojujících jednotlivá ganglia ?

Byly prokázány NOS – pozitivní axony propojující jednotlivé oblasti ganglií ?

Většina NOS – pozitivních neuronů v CNS savců má charakter lokálních interneuronů. Mají obdobný charakter i NOS – pozitivní neurony u Aplysie ?

Má rozdílná NOS – immunopositivita (slabě x silně pozitivní neurony) neuronů Aplysie korelát v jejich funkčních vlastnostech ?

Byl nalezen nějaký rozdíl mezi pozitivitou AcNOS mRNA a NOS pozitivitou ?

Jak si autorka vysvětluje pokles aNOS mRNA v gangliu po poranění pedálního nervu. Po zhmoždění nebo axotomii hlavových nervů u savců (např. n. VII., X., XII.) dochází v neuronech jejich motorických jader s určitým zpožděním k upregulaci NOS.

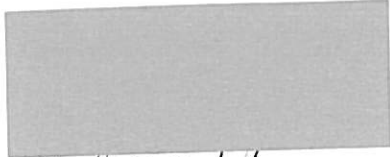
Obdobná upregulace NOS byla prokázána v neuronech spinálních ganglií savců. Naproti tomu po axotomii nedochází k upregulaci NOS v míšních motoneuronech savců.

Sensorin – A pozitivní neurony v centrálních gangliích Aplysie představují representaci povrchu těla, pravděpodobně pro bolestivé signály. Jsou k dispozici údaje o representaci povrchu těla v centrálních gangliích Aplysie pro signály jemnějšího, dotykového cití ?

Témata, která autorka řešila patří mezi závažné otázky základního výzkumu. Při řešení byly použity špičkové techniky molekulárně biologického výzkumu, které autorka velmi dobře ovládá a jejichž výsledky dokáže interpretovat a zařadit do literárního kontextu. Prakticky všechny dosažené výsledky jsou prioritní, nebo významně rozšiřují dosavadní znalosti. I když se na jednotlivých studiích podílelo několik autorů, autorka přesně svůj podíl vymezila. Formální zpracování disertace včetně obrazové dokumentace je na vysoké úrovni. Výsledky uvedené v disertaci a v příložených publikacích mají velký význam pro rozvoj oborů do kterých zasahují.

MUDr. Michaela Buganová prokázala schopnost samostatné vědecké práce a protože i dále vyhověla všem zákonným podmínkám, doporučuji aby jí na základě dosažených výsledků a po jejich obhájení byl udělen titul „Ph.D.“ za jménem.

V Praze 16. června 2008.



Prof. MUDr. Rastislav Druga, DrSc.
Anatomický ústav 2. lékařské fakulty
Univerzity Karlovy v Praze