

**Oponentský posudek na dizertační práci ing. Ivana Mikuly s názvem:
„Eukaryotic and prokaryotic nitric oxide synthases – structure-function
studies“**

Předkládaná dizertační práce je komentovaným souborem šesti publikovaných prací (a jedné práce odeslané k publikaci) v mezinárodních časopisech a lze v ní identifikovat zhruba 3 okruhy zájmu:

- i) Studium kinetických a dynamických vlastností okolí hemu v NO-synthase (NOS) za použití bakteriálních proteinů podobných NOS, které vykazují vysokou homologii s oxygenasovou doménou savčí NOS.
- ii) Zjišťování schopnosti izoform NOS vykazovat nitritreduktasovou aktivitu, a tak alternativně produkovat NO za fyziologických podmínek.
- iii) Charakterizovat nově popsany rostlinný protein, kterému byla připisována aktivita NOS.

Dizertační práce je opatřena velmi dobře napsaným úvodem, resp. Přehledem literárních údajů. Následuje pak kapitola Výsledky a diskuze, kde se do jisté míry opakuje to, co si lze přečíst v příložených publikacích. Jinak však tato kapitola nejspíše nejde napsat. Dobře je také napsaný Závěr. Seznam použité literatury je prezentován neobvykle úsporným způsobem, kdy je uváděn jen první autor. To je celkem pochopitelné, protože většinu literárních údajů lze nalézt, řádně citovaných, v příložených publikacích. Ovšem, i tak úsporným způsobem psané literární údaje by měly být uváděny jednotně (někdy pp., jindy ne; někdy volum a číslo časopisu, jindy jen volum).

Všechny publikace, které jsou součástí předkládané dizertační práce byly (až na jednu, která je odeslaná do časopisu) publikovány v mezinárodních biochemických časopisech, velmi často v časopisech, které mají vysoký „impact factor“. Musely tedy projít důkladnou mezinárodní recenzí a přináší tedy nepochybně výhradně nové významné poznatky. Za nejzajímavější zjištění považuji: i) Nález druhého vazebného místa pro NO v katalytickém místě některých NOS. ii) Zjištění, že eNOS, ale nikoli nNOS a iNOS vykazuje za podmínek nedostatku kyslíku nitritreduktasovou aktivitu. iii) Zjištění, že rostlinný protein AtNOS1 (NOA1), který měl mít aktivitu NOS, takovou aktivitu nemá a má zcela jiné funkce.

Výsledky prezentované v dizertační práci mají jistě významný dopad pro další výzkum, a to nejen v oblasti NO. Lepší porozumění mechanismu vzniku NO za


katalýzy NOS a podrobné znalosti aktivního místa NOS mohou vést k syntéze velmi specifických modulátorů, a to jak savčí NOS, tak bakteriálních proteinů podobných NOS, a tak ovlivňovat patogenicitu některých bakterií. Zjištění nitritreduktasové aktivity eNOS za hypoxických podmínek pak může mít v budoucnu vliv na řešení akutního ischemického poškození. Zjištění pravé biologické funkce rostlinného proteinu NOA1 pak snad definitivně rozhodlo o tom, že se nejedná o NOS.

K autorovi bych měl 2 otázky:

1. Kde si detailně představuje, že je umístěno druhé vazebné místo pro NO v katalytickém místě NOS?
2. Jak si vysvětluje, že nNOS a iNOS nemají nitritreduktasovou aktivitu za hypoxických podmínek?

Závěrem bych chtěl konstatovat, že podle mého názoru předkládaná dizertační práce zcela splňuje požadavky kladené na takoveto práce a jistě dokládá předpoklady autora k samostatné vědecké práci. V případě úspěšné obhajoby doporučuji jednoznačně udělení titulu „Ph.D.“

V Praze dne 24. srpna 2010


Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc.
Katedra biochemie PŘF UK Praha