



Oponentský posudek disertační práce Ing. Ivana Mikuly : „ Eukaryotic and prokaryotic nitric oxide synthases – structure function studies

prof. RNDr. Vladimír Král DSc.

Disertační práce Ing. Ivana Mikuly je zaměřena na studium funkce nitric oxid synthasy a to především studium vztahu struktury a funkce a studium aktivity jednotlivých isoform za různých podmínek. Z hlediska zadání se jedná tedy o závažné téma, které rozhodně sleduje moderní trendy v dané oblasti. Cíle práce byli

- sledování interakce bakteriálních nitric oxid synthás z substráty, inhibitory a komplexy železa za různých podmínek
- studium kinetických a dynamických vlastností hemového mikroprostředí nitric oxid synthasy
- studie vlivu různých podmínek, zvláště anoxie a hypoxie na aktivitu savčích nitric oxid synthás za použití nitrátu jako substrátu
- charakterizace, objasnění funkce proteinu ATNOS1 a jeho savčích orthologůV.

Předložená disertační práce je rozdělena na přehled přiložených odborných prací publikovaných autorem (7 prací), teoretickou část v rozsahu 19 stran, výsledky a diskuze (10 stran), závěry, použitou literaturu a samotné práce, které autor publikoval na dané téma a na které jsou v disertaci představeny.

Teroretická část

Vzhledem k tomu, že počáteční části jednotlivých přiložených publikací obsahují úvodní kapitoly, je pochopitelné a akceptovatelné, že teoretická část disertace není příliš rozsáhlá. Z obsahového hlediska je plně dostačující. Co se týče formálního hlediska, tak zde bylo lepší použít značení citací texty číslicí v horním indexu než zde použitým způsobem.

Výsledky a diskuze

Vzhledem k formátu předkládané disertační práce je samotná diskuze rozčleněna na jednotlivé podkapitoly podle přiložených prací. Samotná diskuse stručná a slouží spíše pro získání rychlého náhledu pro danou publikaci. Což je poněkud nezvyklé, ale akceptovatelné vzhledem k tomu že, jednotlivé dílčí výsledky jsou zevrubně diskutovány v jednotlivých pracích.

- Spektroskopická studie bakteriálních nitric oxid synthasy prokázala jejich podobnost s obdobnými savčími proteiny, zároveň byly pozorovány rozdíly mezi jednotlivými typy (*S. Aureus* a *B. anthracis*) při interakcích nízko molekulárními ligandy.
- Byla popsána regulace dynamiky uvolňování NO z enzymu za pomoci vodíkových vazeb mezi hemovou prostickou skupinou, substrátem a tertrahydrobiopterinovým kofaktorem. Na základě kinetických měření byla predikována přítomnost druhého vazebného místa nitric oxid synthás.
- Byl pozorován *in vivo* a *in vitro* výrazný rozdíl mezi chováním endoteliální isoformou, která vykazovala nitroreduktázovou aktivitu i při úplné absenci kyslíku za přítomnosti nitritů, za pomoci další biosyntetické dráhy, na rozdíl od dalších dvou isoform.

- Výsledky této části disertační práce popřely přímou účast savčích ortologů AtNOS1 na produkci NO. Nicméně se podařilo najít jeho funkci týkající se assemblaci mitochondriálního ribosomálního chromosómu.

Z uvedených výsledků a jejich diskuze lze jednoznačně konstatovat, že autor zadané cíle ve své disertaci nad očekávání splnil. Formálně lze namítnout, že by názvy mikroorganismů měly být psány kurzivou a pořadí bodů v cílech práce by mělo odpovídat pořadí v závěru. Kvalitu této práce po vědecké stránce nelze hodnotit jinak než jako velmi vysokou. Autor zde se opakovaně podílel na významných objevech v této oblasti využitelných v řadě diagnostických a medicínských aplikacích např. selektivní stanovení aktivity jednotlivých isoform nitric oxid synthasy, vývoj nových jejich inhibitorů atd.

Předložené práce

Autor uvádí jako přílohu k disertační práci uvedl 7 prací, z toho jedna je v recenzím řízení. Jedná se o práce publikované v mezinárodních časopisech s dobrým impaktem. Velmi vysoký je citační ohlas samotné prací indukující vysokou originalitu práce a její vysoký význam pro vědeckou komunitu.

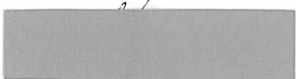
Otázky

1. Ve vaší práci jste se také zabýval změny konformace bakteriálních nitric oxid synthás nízkomolekulárními ligandy. Dokázal by jste ty změny dát do souvislosti s změnou jejich aktivity?
2. Ve vaší práci zaměřené na stanovení aktivity nitric oxid synthasy během anoxie bylo měření provedeno při pH 7,6, nebylo by lepší provést měření při pH 7,0 odpovídající pH normálních buněk nebo při nižším vzhledem k vašemu zájmu o hypoxii?

Závěr

Závěrem mohu konstatovat, že disertant pan Ing. Ivan Mikula splnil ve své práci veškeré zadané úkoly. Dále, disertant projevilschopnost samostatné vědecké práce a prokázal dobrou teoretickou i experimentální připravenost. Vysoká kvalita jeho práce je snadno prokazatelná i na základě publikací, které během svého studia publikoval, či na kterých se podílel. Proto mohu zcela bezpochyby prohlásit, že jsem uvedenou práci prostudoval; předložená Disertační práce přesvědčivě dokazuje předpoklady autora k samostatné vědecké práci a k udělení titulu "PhD" za jménem

V Praze dne 27. 8. 2010


prof. RNDr. Vladimír Král Dsc.