

Oxid dusnatý (NO) má nezastupitelnou roli v neuronální signalizaci v řadě eukaryotických a prokaryotických organizmů. NO-syntázy (NOS) jsou hem-obsahující monooxygenázy, které v přítomnosti kyslíku katalyzují oxidaci L-argininu na NO a L-citrulin. NO produkovaný NOSyntázou

je plynná molekula, která lehce difunduje přes membrány a zprostředkovává jak mezibuněčnou, tak i vnitrobuněčnou komunikaci. NO aktivuje enzymy vážící kovy včetně solubilní

guanylátcyklázy (sGC), a tím zvyšuje hladinu druhého posla cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) (1, 2), který dále zprostředkovává řadu fyziologických a patologických procesů v neuronech. Nicméně, detailní charakteristika nitrergních neuronů a funkce NO v centrální nervové

soustavě (CNS) není zcela objasněna.

Cílem dizertační práce bylo charakterizovat neuronální NOS, proteiny spojené s metabolismem

neuronální NOS a signální dráhu NO v CNS zeje kalifornského (*Aplysia cali/ornica*), populárního

experimentálního modelu buněčných a systémových neurověd.

Na biochemické úrovni byla zjištěna závislost NOS *Aplysie* (/IcNOS) na kalcium- kalmodulinu (Ca-CaM) a NADPH. Řada reprezentativních inhibitorů savčích NOS isoforem též snížila NOS

aktivitu u *Aplysie*. Polyklonální protilátky vytvořené proti krysí NOS hybridizovaly na Western blotu

s purifikovanou /IcNOS (160 kDa protein) z částečně purifikovaných CNS homogenátů.

Aktivita /4cNOS popsaná v této práci byla asi šestkrát nižší než zjištěná aktivita NOS v savčím

mozečku (3), ale aktivita /IcNOS byla srovnatelná s průměrnými hodnotami uváděnými pro nervovou

soustavu hmyzu (4, 5). Stanovili jsme bazální hodnoty produkce cGMP v CNS *Aplysie*.

Stimulace

NOS donory NO nebo inkubace s inhibitory fosfodiesterázy významně zvýšily hodnoty cGMP.

Specifický inhibitor sGC snížil bazální hodnoty cGMP o polovinu a předešel zvýšení cGMP za

přítomnosti NO. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že NO funguje jako posel v CNS

*Aplysie* a že cGMP je jedním z efektorů NO.

Klonovali jsme /IcNOS v jeho plné délce a dokumentovali, že obsahuje všechny konzervované

části charakteristické pro funkční NOS u obratlovců. Lokalizovali a zmapovali jsme nitrergní neurony

v CNS *Aplysie*. Pomocí *in situ* hybridizace a imunohistochemicky byla prokázána přítomnost NOS

v přibližně 2% všech centrálních neuronů.

Optimalizovali jsme protokol pro vícebarevnou *in situ* hybridizaci s použitím celých ganglií („whole mount“), tedy bez nutnosti připravovat řezy. S využitím této nově zavedené metody jsme identifikovali neurony, ve kterých jsme následně korelovali jejich proteinová expresní data a jejich funkci. Tím jsme sestavili i úplnou topografickou mapu uspořádání mechanosensorických neuronů v CNS *Aplysie* exprimujících neuropeptid sensorin-A.

Hodnotili jsme působení jednostranného mechanického poškození „nožního“ nervu na úroveň exprese NOS mRNA v neuronech „nožního“ ganglia v souvislosti s funkčním

významem NO v regeneraci nervů a u neuropatických bolestí. Výsledky *in silu* hybridizace a denzitometrie prokázaly snížení počtu niterních neuronů a intenzity neuronálního zbarvení na straně poškozeného nervu a současné zvýšení /IcNOS mRNA v axoplasmě stejnostranného „nožního nervu“ pomocí RT-PCR

Část dizertační práce se soustředila na identifikaci dalšího funkčně významného hemoproteinu,

thyroidperoxidázy z *Aplysie* (/IcTPO). Po naklonování /IcTPO genu a lokalizaci /IcTPO transkriptu

v CNS *Aplysie* jsme prokázali i přítomnost několika dalších transkriptů. Tyto transkripty přímo

souvisejí s thyroideální signalizační dráhou a naznačují funkci a přítomnost látek podobných thyroideálním hormonům i u plžů.

Téma hemoproteinů v této dizertační práci vedlo dále ke studiu hemové syntetické dráhy, konkrétně šestého enzymu této kaskády, koproporphyrinogenoxidázy (CPO). CPO jsme klonovali z

*Aplysie* a dalších organismů (*Chlorophlexus auranliacus*, *E.coli*). Klonované CPO jsme použili při

optimalizaci krystalizačních podmínek vedoucích k prvnímu publikování krystalové struktury lidské

CPO. Krystalová struktura umožnila udělat další krok k pochopení katalytického mechanismu CPO a

na molekulární úrovni objasnit snížení enzymatické aktivity u jednotlivých patologických mutaci

hereditární koproporfýrie.