

Posudek školitele k obhajobě doktorské disertační práce Mgr. Nikolý Kovářové.

Mgr. Nikola Kovářová absolvovala postgraduální studium v oboru Biochemie a patobiochemie ve Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky v Oddělení bioenergetiky, od r. 2008 do r. 2016. Program jejího doktorandského studia se uskutečnil v rámci dlouhodobé spolupráce mezi Oddělením bioenergetiky FGÚ AV ČR, Klinikou dětského a dorostového lékařství a Ústavem dědičných poruch metabolismu I. LF UK a VFN a byl zaměřen na problematiku dědičných poruch mitochondriálního energetického metabolismu s cílem získat nové poznatky o regulaci a poruchách tvorby cytochrom *c* oxidázy (COX), terminálního enzymového komplexu dýchacího řetězce. Multipodjednotkový komplex COX je složitě regulován řadou faktorů a metabolitů a izolované defekty COX vedou k těžkým encefalo-kardiomyopatiím a jsou způsobené zejména mutacemi v jaderných genech kódujících specifické asamblční faktory nebo v mitochondriálních genech (mtDNA) pro katalytické podjednotky enzymu.

Mgr. Kovářová se specificky věnovala charakterizaci změn v biogenezi COX vyvolaných absencí regulačního faktoru SURF1, která je nejčastější příčinou dědičného defektu COX s manifestací fatálního Leigh syndromu. Zaměřila se na de-novo syntézu enzymu, jeho zabudování do superkomplexů dýchacího řetězce, respirasomu a stabilitu a odbourávání nekompletních forem COX v mitochondriích. Regulační úlohu SURF1 faktoru analyzovala jak u pacientů s mutacemi *SURF1* genu, tak pomocí myšního modelu *SURF1* knockoutu. Program postgraduálního studia dále zahrnoval studium dědičného defektu COX na podkladě mtDNA mutace *ATP6/COX3* genu a studium možného zabudování flavoproteinových dehydrogenáz dýchacího řetězce do savčích respiračních superkomplexů.

Během postgraduálního studia si Mgr. Kovářová osvojila široké spektrum moderních biochemických a molekulárně-biologických metod od buněčných kultivací, izolací mitochondriálních organel, oxygrafických a fotometrických analýz respiračních enzymů, přes implementaci transmitochondriálních cybridů a myšního modelu ablace SURF1 faktoru až po komplexní proteinové analýzy pomocí imunodetekčních a MS metod, imunoprecipitací a zejména nativních a vícerozměrných elektroforéz, umožňujících detailně studovat tvorbu a interakce membránových proteinů.

Experimentální program Mgr. Kovářové přinesl řadu významných výsledků, které přispěly k objasnění molekulárního mechanismu poruchy tvorby COX u dysfunkce SURF1 faktoru a jeho odlišností na tkáňové a mezidruhové úrovni, od vzniku raných asamblčních intermediátů až po tvorbu superkomplexů a následné kompenzačně-adaptační změny v respiračním řetězci na podkladě posttranskripčních mechanismů. Práce disertantky analyzující mtDNA mikrodeleci v *ATP6/COX3* genu pomocí cybridů objasnila patogenní mechanismus onemocnění, kdy manifestace defektu COX nastává až při více než 90% podílu mutované mtDNA. Pomocí nativních elektroforéz a solubilizace mitochondriálních membrán digitoninem byly odhaleny vysokomolekulární a enzymaticky aktivní formy dvou flavoproteinových dehydrogenáz, SDH a GPDH. U SDH byla prokázána asociace do K_{ATP} kanálu, ale ani jedna z dehydrogenáz neukázala přímou strukturní interakci s COX, nebo komplexy I a III dýchacího řetězce.

Mgr. Kovářová je metodicky vyspělým, teoreticky vzdělaným a velmi precizním vědeckým pracovníkem s aktivním přístupem ke studované problematice. Svoji prací významně přispěla k úspěšnému řešení několika grantových projektů (IGA MZd ČR, MŠMT ČR, GAČR a UK) řešených ve Fyziologickém ústavu AVČR, na 1. Lékařské fakultě UK a ve spolupráci se skupinou Prof. M. Zevianiho v Istituto Carlo Besta v Miláně a MRC v Cambridgi. Kvalitu výsledků jejího doktorandského studia nejlépe dokumentuje celkem 5 publikací v renomovaných zahraničních časopisech (1x Biochemical Journal, 2x Biochimica Biophysica Acta - Molecular basis of disease, 1x Biochimica Biophysica Acta – Bioenergetics, 1x Plo

V Praze, 14.3.2016

MUDr. Josef Houštěk, DrSc.
Oddělení bioenergetiky
FGU AVČR