

Prof. dr hab. Andrzej Dżugaj  
Instytut Genetyki i Mikrobiologii  
Uniwersytetu Wrocławskiego  
ul. Przybyszewskiego 66/77  
51-148 Wrocław

**Recenzja przewodni doktorskiego mgr Magdaleny Wujak pt. „Charakterystyka i ocena roli kinazy adenylanowej w fizjologii i patologii układu krwionośnego”.**

Temat:

Wkrótce po transformacji ustrojowej przyjechał do Polski prof. Laskowski amerykański biochemik polskiego pochodzenia. Na wykładach przedstawiał wyniki swoich badań, ale też dawał dobre rady dotyczące tematyki badawczej, czym polscy uczeni mogą się zajmować a jakich tematów unikać. Wg prof. Laskowskiego należało unikać tematów gorących, ważnych ze względów poznawczych, a których wyniki mogłyby mieć praktyczne zastosowanie np. w diagnostyce lekarskiej. Prof. Laskowski mówił, że nad takimi tematami pracuje wiele zespołów badawczych i polskie zespoły nie mają szans na osiągnięcie dobrych wyników w warunkach ostrej konkurencji, przy naszych licznych brakach aparaturowych i odczynnikowych. Rady prof. Laskowskiego wynikały ze znajomości polskich realiów i były podyktowane ogromną życzliwością, jaką niezmiennie wykazywał w stosunku do Polaków.

Temat pracy doktorskiej zaproponowany przez prof. Komoszynskiego Pani Magdalenie Wujak należy do takich gorących tematów. Utrzymywanie stałego stężenia związków wysokoenergetycznych jest niezbędnym warunkiem prawidłowego funkcjonowania komórki, a stan energetyczny komórki może być i jest monitorowany na wiele sposobów będąc ważnym wskaźnikiem stanu zdrowia organizmu. Odkrycie ATP było kolejnym krokiem milowym na drodze poznawania cząsteczek występujących w żywej komórce i niezbędnym etapem na drodze odkrycia glikolizy fosforylującej czyli

szlaku Embdena-Meyerhofa-Parnasa. A więc temat temat gorący czyli krok śmiały, ale w przypadku prof. Komoszyńskiego w pełni uzasadniony. Jego dorobek w dziedzinie ektoenzymów i znajomość reakcji katalizowanych przez nukleozydazy umożliwiły prawidłowe planowanie badań i analizowanie wyników doświadczeń.

Warsztat badawczy:

W ciągu minionych 25 lat dokonał się ogromny postęp w wyposażeniu naszych laboratoriów. Prof. Laskowski słusznie przestrzegał przed podejmowaniem tematów gorących. Każdy kto ma lat 50 i więcej pamięta czasy gdy na zamówione odczynniki czekało się latami. Spektrofotometry pojawiały się tylko w nielicznych laboratoriach a wirówki najczęściej pochodziły z NRD. Ogromny skok dokonał się w enzymologii. Enzymy izolowało się z tkanek pochodzących ze zwierząt eksperymentalnych takich jak króliki, szczury lub myszy nieliczni otrzymywali tkanki do badań z Zakładów Medycyny Sądowej, a o enzymami rekombinowanym zajmowali się nieliczni badacze. Sądząc po wynikach uzyskanych przez Panią Magdalenę Wujak laboratorium prof. Komoszyńskiego jest dobrze przygotowane do prowadzenia nowoczesnych badań.

Cel pracy:

Charakterystyka właściwości fizykochemicznych i kinetycznych izoenzymów AK1 i AK2 człowieka było pierwszym celem badań. W drugim etapie analiza aktywności kinazy adenylanowej w surowicy krwi pacjentów z ostrymi zespołami wieńcowymi w celu wykazania różnic w aktywności AK we krwi w warunkach fizjologicznych i patologicznych oraz stwierdzenie czy w diagnostyce zawału serca można używać kinazy adenylanowej jako markera tego schorzenia. Trzeci etap to próba wyjaśnienia AK w regulacji hemostazy.

Wyniki:

Izoenzymy kinaz adenylanowych są dostępne komercyjnie ale mają kiepskie parametry kinetyczne. Pozostawała izolacja z tkanek lub otrzymanie enzymów rekombinowanych. W badaniach doktorantka posłużyła się enzymami rekombinowanymi czyli musiała poznać techniki stosowane w biologii molekularnej zaczynając od konstrukcji plazmidu a kończąc na produkcji białek przez szczepy bakteryjne. Porównując białka otrzymywane z tkanek z białkami rekombinowanymi obie techniki mają swoje wady i zalety. Zaletą białek rekombinowanych jest wysoka wydajność preparacji, natomiast często wprowadza się dodatkowe sekwencje aminokwasowe np.

reszty histydynowe, co może wpływać na właściwości enzymów. W przypadku izolowania białek zasadniczym celem jest otrzymanie białka takiego jakie występuje *in vivo*. Niektóre z białek występujące w komórce ulegają potranslacyjnej modyfikacji np. ulegają fosforylacji lub glikozylacji lub jak niektóre z kinaz mirystylacji natomiast białka rekombinowane nie ulegają potranslacyjnej modyfikacji, a więc mogą się różnić od białek występujących *in vivo*, gdyż potranslacyjna modyfikacja w wielu przypadkach zmienia właściwości kinetyczne enzymów. Natomiast Izolowaniu białek z tkanek często towarzyszy niepożądana modyfikacja proteolityczna, jak np. przy otrzymywaniu kryształów mięśniowej aldolazy metodą Taylora.

Na wstępie doktorantka dokonała analizy bioinformatycznej sekwencji AK1 i AK2, uważam że jest to właściwy krok przed produkcją AK1 i AK2 w komórkach bakteryjnych

Doktorantka otrzymała dwa izoenzymy AK1 i AK2 elektroforetycznie homogenne i mogła przystąpić do oznaczania parametrów kinetycznych izoenzymów. Przyrost produktu był mierzony punktowo Wyznaczenie  $K_m$  dla enzymów katalizujących reakcje dwusubstratowe jest bardziej złożone aniżeli dla  $K_m$  dla reakcji jednosubstratowych. Zależności szybkości reakcji od stężenia substratu, zależności szybkości reakcji od pH oraz od stężenia jonów metali zostały przedstawione w postaci wykresów. Są to ważne wyniki zasługujące na opublikowanie natomiast przed publikacją proponuję zebranie oznaczonych parametrów kinetycznych w tabeli. Taka tabela przydała by się również w niniejszej dysertacji.

Po wyizolowaniu izoenzymów AK1 i AK2 i wyznaczeniu ich parametrów kinetycznych doktorantka przystąpiła do badań klinicznych mierząc aktywności kinazy adenylianowej w surowicy krwi pacjentów z ostrymi zespołami wieńcowymi w celu wykazania różnic w aktywności AK we krwi w warunkach fizjologicznych i patologicznych oraz stwierdzenie czy w diagnostyce zawału serca można używać kinazy adenylianowej jako markera tego schorzenia. Z własnych doświadczeń wiem jak trudne są badania kliniczne. Wymagają współpracy z lekarzem lub lekarzami, ponadto zawierają duży element przypadkowości. Badani pacjenci powinni być w jednym przedziale wiekowym a badanych przypadków powinno być nie mniej niż 30. Niestety otrzymane wyniki nie wskazują na to aby kinazy adenylianowe mogły służyć jako marker ostrych zespołów wieńcowych

Trzecia część pracy była próbą wyjaśnienia roli AK w regulacji hemostazy. Doktorantka stwierdziła, że AK1 nie hamuje agregacji płytek krwi.

Na zakończenie Doktorantka przedstawiła następujące wnioski będące podsumowaniem

pracy:

1. ATP w wysokich stężeniach staje się ligandem modyfikującym strukturę AK kinetyka obu izoenzymów staje się sigmoidalna i następuje wzrost syntezy ADP.
2. Aktywność kinaz rośnie w pH kwaśnym wskazuje to na rosnącą rolę w regulacji ładunku energetycznego w warunkach niedotlenienia.
3. Jony magnezu, manganu i kobaltu stymulują aktywność AK1
4. W aktywności kinazy adenylnowej w surowicy krwi człowieka największy udział ma izoenzym AK1
5. Niskie powinowactwo AK1 do ADP powoduje, że ten izoenzym nie hamuje agregacji płytek krwi
6. Doktorantka sugeruje, że główną przyczyną wzrostu aktywności kinazy adenylnowej w surowicy krwi pacjentów z zawałem serca jest uszkodzenie błony komórkowej kardiomiocytów.
7. Doktorantka nie znalazła korelacji między aktywnością kinazy adenylnowej a stężeniem troponin sercowych co wyklucza stosowanie kinazy adenylnowej jako specyficznego markera zawału serca.

Rozprawa została zaopatrzona obszernym wstępem napisanym w sposób kompetentny w oparciu o współczesną literaturę przedmiotu. Doktorantka opisała występowanie i właściwości kinaz, jak również ich funkcjonowanie w organizmach zdrowych i w niektórych stanach chorobowych. Język poprawny aczkolwiek nie ukrywam, że szereg terminów nie podoba mi się np. termin solubilizacja. Po przeczytaniu rozprawy nasuwa mi się szereg pytań:

1. Czy nie łatwiej porównywać parametry kinetyczne enzymów jeśli są zebrane w Tabeli ?
2. W jaki sposób ATP modyfikuje struktury kinaz ?
3. Czy wprowadzenie dodatkowych sekwencji do AK1 i AK2 np. łańka heksahistydynowa nie ma wpływu na właściwości kinetyczne enzymów?
4. Jak można by udowodnić, że wzrost aktywności kinazy w surowicy krwi pacjentów jest spowodowane uszkodzeniem błony kardiomiocytów ?
5. Czy uważa Pani, że  $n$  jest miarą ilości podjednostek w wielopodjednostkowym

enzymie?

Praca naukowa nie istnieje, dopóki nie zostanie opublikowana. Przyjęcie pracy do druku oznacza, że przeszła pozytywną ocenę przez niezależnych ekspertów, ale tu trzeba napisać, że nie ma formalnego wymogu publikacji pracy doktorskiej przed jej obroną, choć nie ukrywam, że brak publikacji obniża moją ocenę doktoratu. Natomiast przed wysłaniem pracy do druku proponuję skorygowanie równań przedstawiających reakcję katalizowaną przez kinazy. Kinazy katalizują reakcję odwracalną, w rozprawie rysunki wskazują na reakcję nieodwracalną.

Cennym źródłem wiedzy o pracach i uczonych jest PubMed. Znalazłem tam informację, że Pani M. Wujak jest pierwszym autorem lub współautorem czterech publikacji. Dwóch eksperymentalnych: Roszek K, Błaszczak A, **Wujak M**, Komoszyński M. *Biochem Cell Biol.* 2013 91(3):176-81..

**Wujak M**, Banach M, Porowińska D, Piskulak K, Komoszyński M. *Phytochemistry.* 2013 93:8-17

i dwóch przeglądowych: .Porowińska D, **Wujak M**, Roszek K, Komoszyński M.

*Postepy Hig Med Dosw.* 2013 1;67:119-29. **Wujak M**, Komoszyński M. *Postepy Biochem.* 2011;57(1):92-100.

Sądząc po streszczeniach artykułów prace te nie pokrywają się z rozprawą doktorską. Są to jak mówił nasz klasyk „plusy dodatnie”.

Wracając do kwestii doktoratu, doktorat to przecież egzamin z umiejętności prowadzenia badań, opanowania warsztatu oraz wiedzy z tego obszaru w którym były prowadzone badania jak również wiedzy ogólnej z biochemii i biologii molekularnej. Odnosząc te kryteria do Pani Magdaleny Wujak oraz biorąc za podstawę oceny jej rozprawę doktorską, jak również jej dorobek publikacyjny stwierdzam, że mgr Magdalena Wujak spełnia wszystkie wymagania stawiane osobom ubiegającym się o stopień doktora i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika wnioszek o dopuszczenie mgr Magdaleny Wujak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
Andrzej Dzugaj

Wrocław 03.09.2015