



POLSKA AKADEMIA NAUK

Prof. dr hab. Jan Barciszewski



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
tel.: centrala 61 852 85 03, sekretariat 61 852 89 19
fax: 61 852 05 32, e-mail: ibch@ibch.poznan.pl
REGON 000849327
NIP 777-00-02-062

e-mail: Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl

03.09.2015

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Magdaleny Wujak

pt. Charakterystyka i ocena roli kinazy adenylanowej w fizjologii i patologii układu krwionośnego

1. Charakterystyka tematyki badawczej rozprawy

Praca dotyczy charakterystyki i aktywności białek katalizujących fosforylację nukleotydów. Związki te są kluczowymi nośnikami energii niezbędnej do funkcjonowania komórki. Jednym z enzymów katalizujących ich syntezę jest kinaza adenylanowa (AK, ATP-AMP fosfotransferaza, EC 7.4.3). Katalizuje ona odwracalną reakcję przeniesienia grupy fosforanowej głównie (ale nie tylko) z ATP do AMP w obecności jonów metali dwuwartościowych, prowadzącą do powstania ADP. Enzym ten katalizuje także drugą reakcję syntezy ATP. AK uczestniczy w syntezie *de novo* oraz utrzymywaniu odpowiedniego stężenia nukleotydów adeninowych, zaangażowanych w różnych procesach komórkowych jak homeostaza energetyczna, sygnalizacja wewnątrz- i zewnątrzkomórkowa czy wzrost i różnicowanie komórek. Kinaza adenylanowa jest kluczowym czynnikiem określającym przeżycie oraz zasoby energetyczne komórek. Utrzymując odpowiednie stężenie nukleotydów adeninowych, AK reguluje glikolizę, cykl Krebsa, syntezę i β -oksydację kwasów tłuszczowych, aktywność kanałów jonowych uczestniczących w sekrecji hormonów peptydowych a także receptorów purynergicznycch, endocytozę cholesterolu a także aktywację i agregację płytek krwi. AK zaangażowana jest w regulację stężenia nukleotydów adeninowych w różnych kompartmentach komórkowych. Enzym ten może być wykorzystany w terapii niektórych chorób układu krwionośnego w celu zapewnienia efektywnego dostępu ATP. Zwiększonej ekspresji AK w kardiomyocytach towarzyszy obniżona aktywność kinazy kreatynowej. Łączenie się płytek krwi może doprowadzić do blokady naczyń krwionośnych a także niedotlenienie komórek serca i mózgu. Zmutowana kinaza adenylanowa może powodować obniżenie stężenia ADP, który indukuje tworzenie skrzepów w uszkodzonych naczyniach krwionośnych.

Nukleotydy adeninowe są najbardziej uniwersalnymi cząsteczkami w organizmach żywych. ATP jest zaangażowany w wielu metabolicznych procesach komórkowych jako główne źródło energii oraz czynnik warunkujący aktywność wielu enzymów. W układzie krwionośnym ATP, ADP i adenozyne uczestniczą w regulacji procesów zapalnych i krzepnięcia krwi oraz w pracy mięśni naczyń krwionośnych.

Z pośród dziewięciu znanych izoenzymów u człowieka, AK1 i AK2 ulegają ekspresji w komórkach układu krwionośnego, regulują homeostazę i wykazują najwyższą specyficzność względem nukleotydów adeninowych,

W związku z tym celem badań objętych rozprawą była charakterystyka biochemiczna dwóch izoenzymów AK1 i AK2. Ponadto ważnym zagadnieniem podjętym w pracy była analiza aktywności AK w surowicy krwi pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym.

2. Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Praca (124 strony) składa się z następujących rozdziałów:

- wstęp, który zawiera krytyczny przegląd literatury dotyczącej sygnalizacji purynergicznej w układzie krwionośnym, charakterystyki kinaz adenylnowych,
- materiały i metody,
- wyniki badań własnych,
- dyskusja,
- wnioski.
- piśmiennictwo (150 pozycji).

Rozprawa przedstawia jasno i przejrzysto założenia i cele badań. Jednoznacznie opisane są poszczególne eksperymenty a wnioski przedstawione klarownie. Praca napisana jest w pierwszej osobie liczby pojedynczej. Doktorantka wielokrotnie i jednoznacznie podkreśla swój udział w badaniach jak „badane przeze mnie enzymy” oraz „moim zdaniem”.

3. Główne wyniki badań przedstawionych w rozprawie

3.1. AK1 i AK2 człowieka otrzymano metodą ekspresji w bakteriach. Białka te zawierały znaczniki S-tag przy końcu aminowym i His-tag przy końcu karboksylowym. AK1 pozyskiwano z rozpuszczalnej frakcji białek bakteryjnych, natomiast źródłem AK2 były ciała inkluzyjne.

3.2. Homogenny enzym AK1 po oczyszczeniu metodą chromatografii powinowactwa na IDA-Sepharose-C3 i Blue-Sepharose charakteryzował się aktywnością właściwą 54 U/mg. AK2

po wstępnym usunięciu dodatkowych białek i chromatografii na IDA-celulozie-C3 oraz renaturacji wykazywał aktywność właściwą 18 U/mg.

- 3.3. Wydajność reakcji kinazowania w obecności obu enzymów była najwyższa dla ATP. Reakcja ta przebiega również w obecności innych trójfosforanów nukleozydów i jest różna dla AK1 (zmniejsza się od ATP, CTP, GTP, UTP, TTP) i AK2 (aktywność zmniejsza się od ATP, UTP, CTP, GTP, TTP).
- 3.4. Aktywności AK1 i AK2 człowieka zależą głównie od różnego stężenia jonów magnezu. Dla AK2 w reakcji syntezy ATP i ADP wynosi ono 6 mM $MgCl_2$. W przypadku AK1 dla syntezy ADP jest to 0.5-2 mM $MgCl_2$.
- 3.5. AK1 w odróżnieniu od AK2 wykazuje wysoką aktywność również w obecności kobaltu.
- 3.6. Doktorantka badając właściwości kinetyczne izoenzymów AK człowieka zauważyła, że klasyczna definicja AK nie jest precyzyjna i wymaga rewizji. Pokazała, że enzymy te wykorzystują nie tylko nukleotydy adeninowe.
- 3.7. AK1 wykazuje wysoką aktywność w kwaśnym pH. Optymalna wartość pH dla syntezy ATP wynosi 5 a dla syntezy ADP ma dwa maksima przy 5 i 8. Obserwacja ta może mieć istotne znaczenie dla regulacji homeostazy nukleotydowej i metabolizmu energetycznego komórki.
- 3.8. Polifosforany dinukleozydów są inhibitorami AK1 i AK2. Ap_5A inhibuje syntezę ATP katalizowaną przez AK1 (95%) i syntezę ADP w 83% przy stosunku do substratów 1:50.
- 3.9. AK1 nie uczestniczy w metabolizmie ADP w proagregacyjnych stężeniach (mikromolowe) i nie hamuje procesu agregacji płytek krwi.
- 3.10. Nie zauważono korelacji między aktywnością kinazy adenylanowej a stężeniem troponin sercowych.

4. Uwagi dotyczące wyników oraz pracy

- 4.1. Doktorantka na podstawie pracy przeglądowej innych autorów, opracowała rycinę przedstawiającą udział zewnątrz komórkowych enzymów w metabolizmie puryn oraz zaznaczyła udział kinazy adenylanowej. Mając w świadomości mechanizm reakcji katalizowanej przez AK przedstawiony schemat (Rycina 1) nie jest jednoznaczny.
- 4.2. W paragrafie 2.5 (strona 22) Autorka pisze, że mimo podobnego planu budowy sekwencje aminokwasowe ludzkich izoenzymów AK1-AK9 wykazują bardzo zróżnicowane podobieństwo struktur pierwszorzędowych. Wydaje się, że różnice między nimi są zasadnicze i warto przedyskutować ten problem odnosząc się do masy cząsteczkowej tych enzymów.

- 4.3. Obserwowane różnice w specyficzności substratowej względem trójfosforanów nukleozydów, Doktorantka próbuje objaśnić wydajnościami reakcji. Sugeruje, że dla wyjaśnienia tego należałoby określić K_m dla substratów. Można zapytać, dlaczego tego zadania nie podjęła. Ponadto pożyteczne byłoby spojrzenie na budowę centrum aktywnego i swoiste wiązanie zasady heterocyklicznej oraz reszt fosforanowych do tych białek. Ważne znaczenie ma potencjalna ilość miejsc protonodonorowych i protonoakceptorowych oraz inne reguły Lipińskiego.
- 4.4. Analizowano wpływ jonów metali dwuwartościowych (magnezu, manganu, wapnia, cynku, kobaltu, miedzi) na aktywność AK1 i AK2. Poza stwierdzeniem ich zróżnicowanego wpływu na szybkość reakcji katalizowanej przez AK, Doktorantka tej obserwacji szerzej nie analizuje. Można by zapytać o właściwości fizykochemiczne tych jonów oraz ich znaczenie dla aktywności enzymu. Określenie, że jony metalu wiążą się z di- i tri-fosforanem nukleozydu ochraniają ujemny ładunek reszty fosforanowej wydaje się niefortunne.
- 4.5. Doktorantka stwierdza, że przeprowadzona analiza matematyczna wykazała, że AK1 może występować w postaci tetrameru, a AK2 w postaci trimeru. Takie stwierdzenie wymaga pokazania szczegółów tego podejścia a wniosek wymaga mocnego uzasadnienia. Należy zapytać, na jakiej podstawie doktorantka stwierdza, że jej zdaniem tworzenie form oligomerycznych AK1 i AK2 jest spowodowane przez ATP.
- 4.6. W pracy wykorzystywany jest Ap_5A jako inhibitor AK1 i AK2 oraz możliwe konsekwencje tego faktu. Dyskutując o potencjalnych właściwościach polifosforanów i konsekwencjach biologicznych, należy przywołać informacje dotyczące syntezy tego związku w komórkach.
- 4.7. Doktorantka używa wielokrotnie stwierdzenie „moim zdaniem”. Takie postępowanie oparte na solidnych argumentach należy docenić i podkreślić odwagę w wyciąganiu wniosków i stawianiu hipotez. Należy jednak pamiętać, aby nie popaść w obszar spekulacji przywołując bardzo ogólne stwierdzenia słabo uzasadnione (np. str. 101, 102).
- 4.8. Na stronie 109 Autorka pisze, że nie może wykluczyć, że brak hamowania agregacji płytek krwi przez AK1 człowieka, może wynikać z obecności Ap_5A w badanym osoczu. Jeśli tak to nasuwa się pytanie, dlaczego taka analiza nie została wykonana a określona możliwość wykluczona.
- 4.9. Błędy zauważone w pracy. Referencje 137 i 142 są identyczne. Nie ma czasopisma FEBS (Ref. 147). Zapis Ref. 8 jest niejasny. Zapis czasopism jednowyrazowych – Biochem (Ref. 46 i 99). Zapis Ref. 60, 62 i 63, Ref 75, 78, 124, 129.