

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Józefa Trana
pt.: “Analiza Bioinformatyczna, Strukturalna i Funkcjonalna Międzybiałkowych Miejsc
Wiązania Zn(II)”
dla Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne UW

Rozprawa doktorska mgr Józefa Trana pt. “Analiza bioinformatyczna, strukturalna i funkcyjonalna międzybiałkowych miejsc wiązania Zn(II)” została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Artura Krężła. Oddziaływanie biopolimerów z metalami stanowi specjalizację kierowanego przez prof. Krężła Zakładu Chemii Biologicznej. Praca doktoranta znakomicie wpisuje się w tę tematykę, koncentrując się jednocześnie na roli metali w oddziaływaniach czwrtorzędowych białek. Przedstawiona do oceny rozprawa składa się z pięciu opublikowanych już prac, opatrzonych wstępem w języku polskim. Wstęp do pracy wprowadza czytelnika w świat oddziaływań białek z ligandami, termodynamikę i kinetykę tych oddziaływań, metody eksperymentalnego ich badania i znaczenie biologiczne. Głównym akcentem, na który zwraca uwagę doktorant jest zależność stałej asocjacji białek od wiązania jonów metali na oddziaływującej powierzchni oraz na roli jonów Zn^{2+} , pełniących jak wiadomo od kilkadziesiąt lat ważne z tego punktu widzenia funkcje (np. zależne od cynku agregacja insuliny od monomeru po quasi-kryształ). Bardzo szczegółowo temat ten omówiony jest w pierwszej umieszczonej w rozprawie publikacji, w *Trends of Biochem Sci* (A. Kocyla, J. Tran, A. Krężel), obejmującej także wpływ jonów Zn^{2+} na białkowy interaktom całej komórki. Myślenie w kategoriach proteomu i interaktomu doprowadziło doktoranta do pomysłu stworzenia bazy interakcji białek z metalami, ale uwzględniającej tylko takie przypadki, w których wiązanie metalu ma miejsce na powierzchni oddziaływania podjednostek białkowych. Zostało to opisane w kolejnej pracy (J. Tran, A. Krężel) opublikowanej w *J. Proteom. Res.* Wbrew pozornej prostocie pomysłu, narzędzie takie nie zostało przedtem zbudowane w sposób satysfakcjonujący. Głównym powodem trudności z wykorzystaniem bazy (Protein Datbank (PDB) gromadzącej struktury białek jest redundancja, powodująca, że liczba reprezentatywnych struktur jest kilkanaście razy mniejsza niż wszystkich wpisów w bazie. Przykładowo, PDB zawiera ~100 prawie identycznych struktur lizozymu z faga T4, w których mutowano po kolei wszystkie reszty a.a. na alaninę, a więc znaczną nadreprezentację jednego typu struktury. Stąd konieczność klastrowania struktur do tzw. „struktur reprezentatywnych”. Zdaniem Autorów obecnej pracy dotychczasowe rozwiązania (np. MetalPDB

itp) polegające na klastrowaniu sekwencji na 95% progu identyczności powinno się zastąpić 50 procentami, dokładając w zamian identyfikację tożsamości reszt aminokwasowych białka w odległości 5Å od jonu. Zbudowana przez mgr Trana w taki sposób, publicznie dostępna baza InterMetal DB, znajduje około 6500 reprezentatywnych miejsc wiązania metali (np.: 1403 Ca, 1357 Zn, 1100 Mg). Stworzona przez doktoranta baza będzie z pewnością mogła posłużyć do dalszych badań roli jonów metali w tworzeniu i stabilizacji struktur czwartorzędowych i/lub szerzej ich roli biologicznej w komórkach.

Kolejny, trzeci umieszczony w rozprawie artykuł autorstwa doktoranta, M. Podjaska i A. Kręzła to wyjaśnienie roli haczyka cynkowego białka RAD50 w agregacji tego białka. Artykuł, "Relations between Structure and Zn(II) Binding Affinity Shed Lights on the Mechanisms of Rad50 Hook Domain Functioning and Its Phosphorylation" opublikowany w *IJMS*, opisuje zastosowanie wielu metod biofizycznych dla wyjaśnienia różnic w funkcjonowaniu tego białka u człowieka i opisanym jako pierwsze RAD50 z *P. furiosus*. Było to możliwe dzięki opublikowanej strukturze ludzkiego RAD50 pokazującej, że białko to funkcjonuje jako dimer o kształcie "pręta". Powiązanie tej struktury z własną analizą danych eksperymentalnych otrzymanych przy użyciu modelowych peptydów o wzrastającej długości, obejmujących spektroskopię, potencjometrię, SAXS, XANES i EXAFS, pozwoliło na szczegółową analizę czynników stabilizacji dimeru RAD50 przez jony Zn^{2+} . Pokazano ponadto znaczącą destabilizację haczyka cynkowego przez fosforylację Thr 690 w nieznanym jeszcze mechanizmie (przy fizjologicznych stężeniach Zn^{2+} fosforylacja nie powoduje dysocjacji Zn^{2+} z powierzchni dimeru).

Kolejne dwa wieloautorskie artykuły zamieszczone w rozprawie (*Chemistry- A European Journal*, J. Tran - trzeci z 8 autorów oraz *Inorganic Chemistry* – drugi z 6) podejmują, udaną próbę wyjaśnienia trującego oddziaływania jonów rtęci i srebra z białkiem RAD50. Już w pierwszym z tych artykułów, używając szeregu metod biofizycznych pokazano, że w obecności jonów rtęci w pH=7.4, Zn zostaje zastąpiony przez Hg poprzez preferencyjnie powstanie pseudo tetraedrycznego kompleksu w domenie haczyka cynkowego. Podobnie, w drugim z artykułów opisano mechanizm, w którym Ag wiążąc się z RAD50 indukuje oligomeryzację haczyka cynkowego i omówiono konsekwencje zastępowania Zn przez Ag dla genotoksyczności srebra.

Rozprawa doktorska mgr Józefa Trana, jak już wspomniałem powyżej, składa się z tekstów 5 publikacji, których jest on współautorem, poprzedzonych wstępem w języku polskim. Również każda z indywidualnych publikacji poprzedzona jest także krótkim omówieniem w języku polskim. Całość rozprawy liczy 175 stron, z czego wstęp to 50 stron. Merytorycznie, wszelkie elementy ujęte we Wstępie są bardzo kompetentnie omówione ze znajomością najnowszej literatury przedmiotu. Doktorant cytuje prawie 200 oryginalnych publikacji naukowych. Wszystkie napisane w języku polskim teksty mają stosunkowo wiele tzw. "literówek", przy czym charakter błędów (łączenie,

dzielenie wyrazów itp) wskazuje, że jest to efekt zastosowanego sposobu obróbki tekstu, omówionego zresztą oddzielnie na przedostatniej stronie rozprawy. Lektura wstępu pozwala stwierdzić, że rozprawa doktorska prezentuje doskonałą ogólną wiedzę teoretyczną doktoranta.

Niezwykle trafny jest także wybór tematyki pracy dokonany przez doktoranta i promotora rozprawy. O ile oddziaływanie białek z jonami metali badane są od dawna i przez wiele grup badawczych, o tyle zawężenie tych oddziaływań do interfejsów podjednostek w strukturach czwartorzędowych stanowi niszę słabo obsadzoną, bo niełatwą. Doktorantowi udało się uzyskać wiele ważnych wyników istotnych dla zrozumienia roli jonów metali dla stabilności agregatów białkowych, poczynając od bioinformatycznej pracy polegającej na budowie oryginalnej bazy danych, po lepsze zrozumienie toksyczności metali ciężkich na przykładzie wypierania jonów Zn^{2+} z haczyka cynkowego białka RAD 50 – uczestnika kompleksu MRN istotnego w naprawie uszkodzeń DNA. Osiągnięte, przy zastosowaniu mnogości niełatwych metod, wartościowe wyniki pokazują umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej mgr J. Trana.

W rozprawie zaprezentowano oryginalne rozwiązania, nie jednego, ale kilku problemów naukowych w sposób przemyślany i starannie wykonane. Dotyczy to omówionych krótko powyżej, dotychczas niejasnych, aspektów oddziaływania jonów cynku z białkami, a w szczególności ich roli w tworzeniu struktur czwartorzędowych oraz zaburzeń tego oddziaływania pod wpływem obecności ciężkich metali.

Na zakończenie mam sugestię wynikającą z ostrożności formalnej. Częścią rozprawy są prace wieloautorskie. Ponieważ rozprawa powinna dotyczyć pracy doktoranta, wydaje mi się stosowne przedstawienie przez mgr Trana informacji o jego wkładzie do poszczególnych publikacji zamieszczonych w rozprawie. Mogłoby się to stać częścią prezentacji w autoreferacie. Uwaga ta jest nieistotna dla następującej po niej konkluzji, ponieważ nie ulega wątpliwości, że wkład doktoranta jest wystarczający na potrzeby uzyskania stopnia doktora.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa mgr Józefa Trana spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim (wyszczególnione w art.187 ustawy "Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce", podkreślenia powyżej, i wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uwr o dopuszczenie magistra Józefa Trana do dalszych etapów przewodu.

Uważam ponadto, że ze względu na ważność uzyskanych w rozprawie wyników, potwierdzoną kilkoma publikacjami w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, rozprawa zasługuje na wyróżnienie.

Stellenberg -