



Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział
Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
Prof. Paweł Kafarski
e-mail: pawel.kafarski@pwr.edu.pl



Wrocław 06.05.2017

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Agnieszki DROZD
„Characteristics of stability and reactivity of the human metallothionein isoforms in the context of cellular zinc homeostasis”

Praca mgr Agnieszki Drozd to przykład niezwykle solidnej pracy z pogranicza chemii i biologii. Stanowi ona kontynuację badań prowadzonych przez grupę prof. Artura Krężela i dotyczy zdefiniowania fizjologicznej roli metalotionein, która nie jest jednoznaczna. Na przykład, jednym z ważnych problemów dotyczących tej grupy białek jest pytanie dlaczego w organizmie ludzkim występuje tak wiele ich izoform i jaka jest rola poszczególnych z nich. Praca doktorska Pani mgr Agnieszki Drozd jest ważnym krokiem poszukiwania odpowiedzi na to pytanie.

W pierwszym etapie Autorka pracy otrzymała i oczyściła 10 izoform tych białek zarówno pozbawionych jonu metalu, jak i wysyconych jonem cynku. Sposób uzyskania tych rekombinowanych białek jest oryginalny i kreatywny. Następnie zbadała jak poszczególne izoformy wiążą sekwencyjnie jony cynku i kadmu (te drugie ponieważ można było zastosować tu technikę UV-Vis), oraz jak metalotioneiny wysycone siedmioma jonami cynku oddają te jony wybranym białkom i ligandom małowcząsteczkowym. Miało to na celu sprawdzenie koncepcji, stanowiącej że metalotioneiny mogą stanowić rezerwuar tych jonów w komórce. Przy okazji pokazała, że doniesienia literaturowe wskazujące, iż aktywność metalotionein jest zależna od pH w jakim je się izoluje są nieprawdziwe – ten element rozprawy pokazuje dociekliwość Doktorantki. Duży fragment rozprawy poświęcony jest zdefiniowaniu, które reszty tiolowe cystein zaangażowane są w wiązanie kolejnych jonów cynku. W tym celu Pani mgr Agnieszka Drozd opracowała metodę alkilowania niezwiązanych z jonem cynku reszt za pomocą jodoacetamidu, a po trawieniu uzyskanych adduktów określała, które reszty tiolowe zostały zablokowane przez badanie uzyskanych fragmentów za pomocą techniki HPLC-MS. Fakt, że jony cynku wiążą reszty tiolowe tak, że nie pozwalają na ich alkilowanie tym odczynnikiem jest dla mnie pewnym zaskoczeniem. Ważnymi są też wyniki pokazujące, że nie można przenosić wyników badań uzyskanych z użyciem izolowanych domen metalotioneiny na całe białko, choć wydawało się oczywistym stosowanie takiego rozumowania gdy zważyć znaną budowę przestrzenną metalotionein i sposób wiązania przez nie

jonów metali. Reasumując, trzeba stwierdzić, że praca doktorska Pani Agnieszki Drozd budzi szacunek, gdyż jest to bardzo starannie przemyślany projekt badawczy, zrealizowany w sposób niemal perfekcyjny z niebywałym nakładem pracy i z zastosowaniem całej gamy technik badawczych. O nakładzie pracy świadczyć może chociażby fakt, że skondensowane omówienie metodyki badań to 27 stron tekstu.

Praca doktorska jest napisana bardzo dobrą angielszczyzną. W pracy tej znalazłem zaledwie kilka błędów edytorskich, choć czasami nie jestem pewien, czy niektóre sformułowania są gramatycznie poprawne. Małe błędy edytorskie znalazłem na stronach: 7, 19, 89 i 94 – to naprawdę niewiele, ale błąd na stronie 7 jest niestety niedobry. Zostawiam te błędy do znalezienia Doktorantce. Pozostałe z nich wymieniam poniżej głównie po to aby pokazać, że starannie przeczytałem pracę:

- wolałbym, aby na stronie 35 stopnie utlenienia atomów siarki były zapisane jako +2 i +4 zamiast 2 i 4 (choć odnoszę wrażenie, że się czepiam);
- nie widzę strzałek na rysunku 1.9 na str. 40;
- nie ma tabeli 3.1.1. (jest tabela 3.1) – str. 66;
- na str. 116 Autorka pisze o sześciu pozostałych jonach cynku – tak naprawdę są to jony trzy (mimo, że rozumiem o co chodzi);
- w podpisach do rysunków 5.8 i 5.11 linie na wykresie są opisane kolorami, a u mnie na rysunkach są o różnych odcieniach szarości (na szczęście można się zorientować, który jest który);
- izoformy nie są szybkie, szybka jest wymiana jonów z ich udziałem (str. 121);
- dane z Tabeli 5.6 (str. 130) nie korespondują z tekstem ani z rysunkami rozdziału 5.11;
- Autorka pisze, że badanie kompleksowania jonów metali przez omeny alfa i beta metalotionein jest DZISIAJ coraz bardziej popularne, a cytuje tu pracę z roku 2002;
- Na stronie 151 kompleks z kadmem nazwany jest Zn_4L (można tak było zrobić bo wiadomo o co chodzi), co odbiło się jednak czkawką w Tabeli 7.2, gdzie powinno być w trzeciej kolumnie „with Cd^{2+} ”.

Przy okazji mam pytanie Doktorantki – czy jest jakieś wytłumaczenie dlaczego błąd pomiaru liczby jonów Zn^{2+} przypadających na cząsteczkę MT1a (Tabela 5.3.) zmierzony za pomocą ICP jest tak wielki i tak znacznie odbiega od błęd innych pomiarów w tej Tabeli?

Praca doktorska Pani mgr Agnieszki Drozd poprzedzona jest omówieniem literatury, który stanowi nieco ponad 20% objętości pracy i bardzo dobrze wprowadza czytelnika w część badawczą rozprawy. Jest on napisany w sposób zwarty i kompetentny. Niezwykle dobre wrażenie robi opis celu pracy. W ogóle praca jest napisana w taki sposób, iż mimo skomplikowanych niekiedy eksperymentów czyta się ją dobrze. Jest tak oprócz jednego wyjątku – czytanie

ze zrozumieniem paragrafu 8.6 jest nieomal niemożliwe bez częstego korzystania z paragrafu 8.7. Przy okazji, nie jestem przekonany, że rozdzielenie omówienia wyników od ich dyskusji było dobrym pomysłem. Wydaje mi się, że przy takiej konstrukcji pracy jest ona trudniejsza do śledzenia - tym bardziej, że sekwencja dyskusji wyników jest nieomal taka sama. Dodatkowo, brak mi generalnych wniosków jakie można wysnuć podsumowując przeprowadzone badania.

Reasumując, stwierdzam, że przyszło mi recenzować bardzo ciekawą pracę doktorską, której realizacja wymagała dużego nakładu pracy i uporu badawczego. Praca Pani mgr Agnieszki Drozd to przykład kreatywnie zrealizowanego, ciekawego projektu badawczego i spełnia ona w pełni warunki zarówno ustawowe jak i zwyczajowe jakie stawia się pracom doktorskim. Dlatego wnoszę do Wysockiej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mimo to, że wydaje mi się iż wyniki tej pracy nie zostały jeszcze opublikowane, biorąc pod uwagę jakość przeprowadzonych badań i ich niezwykle porządną opis wnoszę o wyróżnienie tej pracy doktorskiej.

