



nencki institute  
of experimental biology

POLSKA AKADEMIA NAUK  
**INSTYTUT BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ**  
**im. M. NENCKIEGO**

dr hab. Grzegorz M. Wilczyński  
profesor nadzwyczajny

Kierownik Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej  
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego  
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa  
tel./fax: 5892355, e-mail: [gwilcz@nencki.gov.pl](mailto:gwilcz@nencki.gov.pl)

---

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. **Piotra Wasąga**  
pt. „**Identyfikacja wewnątrztronowej sekwencji S/MAR bydłęcego genu TH i wiążących ją białek macierzy jądrowej**”

W ostatnich latach obserwujemy rewolucję w globalnym pojmowaniu mechanizmów ekspresji genów dzięki zastosowaniu zarówno wysokoprzepustowych technik typu *chromosome conformation capture*, jak również postępów w wysokorozdzielczej mikroskopii. Obraz jaki się wyłania z tych badań ukazuje jądro jako wysoce ustrukturalizowane i złożone organelum, w którym ekspresja genów regulowana jest na licznych poziomach, przez olbrzymią liczbę czynników. Uzasadnione jest przypuszczenie, że tak złożona struktura musi posiadać elementy pełniące rolę rusztowania lub szkieletu. Od ponad 40 lat prowadzone są badania rybonukleoproteinowej sieci, która powstaje po ekstrakcji z jądra chromatyny i innych rozpuszczalnych elementów, określanej mianem macierzy jądrowej. Obserwacje mikroskopowo-elektronowe tej pozostałości wykazały obecność fibryllo-granularnej substancji wypełniającej wyekstrahowane jądra. Badania składników tej sieci doprowadziły do odkrycia licznych białek, RNA, a także grupy sekwencji DNA wiążących się z macierzą jądrową S/MAR, które, jak się obecnie uważa, mogą pełnić istotną rolę w kompartmentalizacji genomu. Pojęcie macierzy jądrowej jest jednak czasem ostro krytykowane, jako prowadzące do powstawania i obserwacji artefaktów, nie mających znaczącego związku z fizjologią. W ramach kontrargumentu (może tylko nieco przerysowanego), można też powiedzieć, że klasyczna mikroskopia elektronowa oparta jest na niefizjologicznej precypitacji i sieciowaniu które, są poważną ingerencją w fizjologiczny stan komórki, co prowadzi do powstania bezużytecznych artefaktów. Łatwo widzieć, że tak pryncypialne stawianie niektórych argumentów prowadzi do absurdu, bowiem nikt chyba nie wątpi w wartość danych uzyskanych przy użyciu konwencjonalnej mikroskopii elektronowej, choć są pewne ograniczenia. Jestem zdania, że wyniki dotyczące macierzy jądrowej, oparte na rygorystycznej biochemii, dostarczają ważnych i wiarygodnych danych, które powinny wejść w

skład modelu rusztowania jądrowego, czy też nukleoszkieletu, jak to ostatnio zaproponowano. W moim mniemaniu taką rolę odgrywają wyniki ocenianej dysertacji, wnosząc znaczną porcję nowej wiedzy w wyżej wymieniony obszar badawczy.

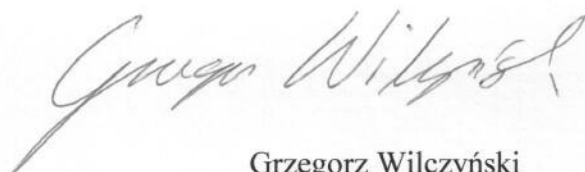
Wstęp do rozprawy jest rozległy, bardzo szczegółowy i dojrzały napisany. Mgr Wasąg nie tylko przedstawił rys historyczny odkrywania macierzy jądrowej ale również opisał procesy w jakich białka macierzy mogą brać udział. Ta część wstępu wskazuje na niezwykłą erudycję autora. W moim mniemaniu jednak niektóre wnioski, co do związków przyczynowych powinny być ostrożniejsze. Pominięte zostały też elementy, które zalicza się do nukleoszkieletu, a które nie są częścią macierzy jądrowej (definiowanej operacyjnie), jak np. motory molekularne. W dalszych częściach wstępu autor z niezwykłą drobiazgowością przedstawia znane fakty na temat genu hydroksylazy tyrozyny (TH) i regulacji jego ekspresji, jestem przekonany, że niektóre prace cytowane w tym fragmencie były czytane i analizowane przez Autora wielokrotnie.

Materiały i metodyka są opisane bardzo dobrze; szczegółowo, a jednak tak przystępnie, że nawet osoba, która większość technik stosowanych w niniejszej pracy zna tylko z literatury (jak ja), może sobie wyobrazić mechanizm ich działania.

Z opisu wyników dowiadujemy się, że w ramach swojej pracy doktorskiej mgr Wasąg określił dokładnie fragment intronu I genu hydroksylazy tyrozynowej TH, który wiąże się z macierzą jądrową. Stwierdził ponadto, że wyizolowany fragment genu TH ma wyższe powinowactwo do macierzy jądrowej w rdzeniu nadnercza, gdzie TH ulega wysokiej ekspresji, niż w wątrobie. Co więcej, Doktorant posługując się trudną techniką *Southwestern* uwidoczniał w rdzeniu nadnerczy grupę 12 białek macierzy jądrowej o masach w granicach od 20 kDa do 112 kDa wiążących się specyficznym z opisaną powyżej sekwencją intronową genu TH. W analogicznych doświadczeniach z tkanką wątroby wykryto 10 białek, w tym kilka o identycznych masach cząsteczkowych jak w przypadku rdzenia nadnerczy; występowały jednak różnice, np. brak białka o masie 112 kDa w preparacie macierzy jądrowej wyizolowanej z wątroby. Może to sugerować lokalną specyfikę macierzy jądrowej rdzenia nadnerczy związaną z ekspresją genu TH. Technika *Southwestern* p. Wasąg zastosował także do dwóch ludzkich linii komórkowych: SH-SY5Y (eksprymującej TH) oraz Hep-G2 (nie eksprymującej TH). W tym przypadku uzyskane wyniki były bardzo odmienne od siebie, jak i od wyników uzyskanych z normalnych tkanek bydłowych. Pan Wasąg stosując metodę EMSA wykazał ponadto, że tak izolowane białka mogą tworzyć kompleksy z analizowanym fragmentem genu TH i że prawdopodobnie są to multimeryczne kompleksy. Nie mam do tej części zastrzeżeń z wyjątkiem kiepskiej jakości Ryc. 3. Na stronie 65 znalazło się zdanie, w którym autor mówi o immunotekcji DNA zamiast o hybrydyzacji. Mam też uwagę językową odnoszącą się do całej pracy, w której p. Wasąg często używa słowa „ilość” w stosunku do rzeczy policzalnych, pisząc np. o „ilości” uzyskanych jąder, zamiast o ich liczbie.

Dyskusja jest napisana dojrzałe. Zestawia ona uzyskane wyniki z danymi pochodzącymi z innych laboratoriów i uzyskanymi przy okazji stosowania innych metod. Co ważne, Autor krytycznie przedstawia wady i zalety stosowanego przez siebie podejścia badawczego. Ciekawy jest fragment, w którym na podstawie mas cząsteczkowych zidentyfikowanych białek Autor proponuje jakie to mogą być białka. Stąd tylko krok do ich identyfikacji metodą super-EMSA. Na koniec mam pytanie, czy w jakiś sposób nie udałoby się wykorzystać w badaniach prowadzonych przez Autora metody spektrometrii mas, która ułatwiłaby identyfikację peptydów?

Podsumowując, w mojej ocenie praca spełnia wszelkie wymagania stawiane dysertacjom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie jej Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wagę uzyskanych wyników dla dalszych badań nad nukleoszkieletem proponuję też wyróżnienie rozprawy.



Grzegorz Wilczyński