

prof. dr hab. Artur Jarmołowski
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Zakład Ekspresji Genów
ul. Umultowska 89
61-614 Poznań
tel. 61-829-5959; fax 61-829-5949
e-mail: artjarmo@amu.edu.pl

Poznań, 08. 06. 2015

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

Praca doktorska mgr Piotra Wasąga została wykonana pod kierunkiem dr hab. Anny Goc, profesora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (UMK), w Zakładzie Genetyki oraz w Pracowni Izotopowej i Analizy Instrumentalnej UMK. Promotorem pomocniczym rozprawy mgr Piotra Wasąga jest dr Robert Lenartowski.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma klasyczny układ. Rozpoczyna się obszernym wstępem, który został napisany jasno i rzeczowo. Podoba mi się przejrzysta i logiczna konstrukcja tej części pracy doktorskiej mgr Piotra Wasąga, a przede wszystkim to, że wszystkie zawarte we wstępie informacje są potrzebne do właściwej analizy przedstawionych w rozprawie wyników. Nie ma tutaj, tak charakterystycznego dla wielu polskich prac doktorskich, niepotrzebnego przeładowania części literaturowej nadmierną liczbą szczegółów, a także fragmentów zupełnie nie związanych z treścią doktoratu. Warto również podkreślić, że wstęp w ocenianej rozprawie doktorskiej został oparty na najnowszej literaturze naukowej. Zaprezentowany przegląd danych literaturowych został napisany ładnym językiem, w zasadzie wolnym od błędów stylistycznych i laboratoryjnego żargonu; jedynie w kilku miejscach zauważyłem drobne pomyłki i nieścisłości, które jednak nie utrudniły mi w najmniejszym stopniu zrozumienie tekstu. Przygotowane przez Doktoranta wprowadzenie literaturowe rozpoczyna się omówieniem pojęcia macierzy jądrowej, jej składu biochemicznego oraz proponowanych modeli ultrastruktury. Druga

obszerna część wstępu poświęcona została roli macierzy jądrowej w różnych procesach komórkowych, przede wszystkim naprawie i replikacji DNA oraz regulacji ekspresji genów. W osobnym podrozdziale wstępu magister Piotr Wasąg zgromadził i omówił dane literaturowe na temat roli macierzy jądrowej w procesach nowotworzenia. W następnym, trzeciej części przeglądu literaturowego Doktorant zajął się hydroksylazą tyrozynową oraz strukturą i ekspresją genu kodującego ten ważny enzym. Magister Piotr Wasąg zwrócił w tej części swojej pracy szczególną uwagę na regulację ekspresji hydroksylazy tyrozynowej na poziomie jej biosyntezy, a także poprzez fosforylację enzymu oraz jego degradację. Sporo miejsca poświęcono tutaj również regulacji transkrypcyjnej genu *TH*. Muszę przyznać, że studiując przygotowany przez mgr Piotra Wasągą wstęp nabierałem coraz większej ochoty na zapoznanie się z wynikami eksperymentów opisanymi w Jego rozprawie doktorskiej, co jest najlepszym dowodem, iż został on napisany w sposób interesujący i przemyślany.

Wstęp ocenianej pracy doktorskiej w naturalny sposób nawiązuje do kolejnego rozdziału rozprawy, w którym Doktorant opisuje cel, jaki przed sobą postawił w ramach pracy doktorskiej. Głównym celem ocenianej przeze mnie rozprawy było poznanie minimalnego obszaru bydlęcego genu *TH*, odpowiedzialnego za interakcje z macierzą jądrową, a także charakterystyka białek, które z tymi sekwencjami oddziałują. Wszystkie omówione w rozprawie doświadczenia zostały zaprojektowane i wykonane w celu zrealizowania tego głównego celu naukowego.

Następny rozdział rozprawy opisuje użyte w badaniach odczynniki, a przede wszystkim metodykę przeprowadzonych eksperymentów, i nie mam do tej części poważniejszych uwag. Warto jednak w tym miejscu podkreślić, że w pracy zastosowano kilka sprawdzonych metod eksperymentalnych, które jednak czasami „trącą myszką” np. southwestern, technika niezwykle popularna wiele lat temu, obecnie najchętniej zastępowana jest metodami opartymi o spektrometrię mas (MS). Chciałby jednak podkreślić, że metody badawcze zastosowane w pracy zostały prawidłowo dobrane do poszczególnych zadań badawczych. Wszystkie zastosowane przez Doktoranta techniki doświadczalne są w rozprawie precyzyjnie opisane; zamieszczone w rozdziale Materiały i metody opisy umożliwiły mi rzeczową analizę wykonanych przez mgr Piotra Wasągą doświadczeń. Nie wątpię także, że będą one pomocne dla innych doktorantów Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika. Proszę mi wierzyć, że to właśnie przyszli

użytkownicy protokołów zamieszczonych w pracach doktorskich są najlepszymi i najsurowszymi recenzentami rozdziału poświęconemu metodom. Mam nadzieję, że mgr Piotr Wasąg przejdzie gładko tę prawdziwą „próbę ognia”.

Najobszerniejszą część pracy stanowi oczywiście omówienie wyników badań Doktoranta. Wszystkie opisane w rozprawie doktorskiej mgr Piotra Wasąga rezultaty mają charakter doniesień oryginalnych, a ich dokumentacja nie budzi większych zastrzeżeń. Wśród wielu interesujących obserwacji przedstawionych w rozprawie, moim zdaniem, na szczególne podkreślenie zasługują:

- wykazanie, że w genie wołowej hydroksylazy tyrozynowej (*TH*) znajdują się sekwencje umożliwiające swoiste interakcje między badanym *locus* i macierzą jądrową,
- udowodnienie, że krótki 210-nukleotydowy fragment intronu I wołowego genu *TH* (nukleotydy od +807 do +1016) wystarcza do wiązania białek macierzy jądrowej,
- identyfikacja białek oddziałujących z sekwencjami *S/MAR* z intronu genu *TH* metodą *southwestern*,
- porównanie puli białek oddziałujących z badanymi sekwencjami *S/MAR*, wyizolowanymi z komórek rdzenia nadnerczy i wątroby,
- wykazanie, że fragmenty 829 i 428, zawierające minimalny obszar *S/MAR* od +807 do +1016, w komórkach rdzenia nadnerczy wiążą się z białkami macierzy jądrowej z większym powinowactwem niż z podobną frakcją białek wyizolowanych z hepatocytów,
- wykazanie, że sekwencje *S/MAR* wołowego genu hydroksylazy tyrozynowej rozpoznawane są także przez białka macierzy jądrowej ludzkich komórek HepG2 i SH-SY5Y.

Poniżej przedstawiam kilka moich spostrzeżeń i komentarzy dotyczących eksperymentalnej części pracy doktorskiej mgr Piotra Wasąga.

1. Opis wyników zawiera bardzo dużo szczegółów metodycznych, które nie tylko nie są wynikami eksperymentów, ale utrudniają ich analizę.
2. Tak jak już wspomniałem wcześniej, nie zastosowano w pracy nowoczesnych metod identyfikacji białek wiążących się z sekwencjami S/MAR, które oparte są na spektrometrii mas (MS). Technika southwestern pozwala na detekcję takich białek, jednak nie umożliwia ich identyfikacji.
3. Dywagacje na temat, jakie to białko, jedynie na podstawie poznania jego przybliżonej masy cząsteczkowej jest nieporozumieniem. Należało chociaż potwierdzić takie przypuszczenia wykonując western, w którym wykorzystano by odpowiednie przeciwciała. Najlepiej jednak zastosować od razu MS białek wiążących się z badanym fragmentem DNA. Jako kontrolę można wykorzystać fragment podobnej długości, ale nie wiążący się z macierzą jądrową.
4. Mam pewne zastrzeżenia do wykonanych testów retardacji żelowej. Moim zdaniem warunki tych eksperymentów nie zostały dobrane optymalnie; rozdział kompleksów DNA/białka powinien być lepszy. Zmieniając warunki rozdziału można było znacznie poprawić uzyskany obraz. Chciałbym również usłyszeć wyjaśnienia Doktoranta, dlaczego zastosowano te a nie inne warunki rozdziału badanych kompleksów.

Przedstawione powyżej uwagi i spostrzeżenia nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej mgr Piotra Wasąga. Przedstawiono w niej szereg interesujących, nowych i ważnych dla nauki obserwacji. Zostały one w ocenianej pracy doktorskiej rzeczowo przedyskutowane w oparciu o dobrą znajomość danych literaturowych, a interpretacja wyników wykonanych doświadczeń nie budzi poważniejszych zastrzeżeń. Pewien niedosyt pozostawia jedynie brak identyfikacji białek wiążących się do S/MAR badanego genu. Mam nadzieję, że mgr Piotr Wasąg będzie kontynuował swoje badania i już wkrótce poznamy nazwy tych polipeptydów.

Oceniana rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Dlatego przedkładam Radzie Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika wniosek o dopuszczenie mgr Piotra Wasąga do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A Jarmolowski', with a stylized, flowing script.

prof. dr hab. Artur Jarmołowski