

Prof. dr hab. Urszula Wojda
Kierownik Pracowni Badań Przedklinicznych
o Podwyższonym Standardzie, Centrum Neurobiologii,
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
tel: (4822) 5892578; email: u.wojda@nencki.gov.pl

Warszawa, 31 sierpnia 2020 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Iwony Nowak

pt. „**Mechanizm supresyjnej aktywności białka MCPIP1 w komórkach nowotworowych pochodzenia neuroektoderlanego**”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Hanny Rokity w Pracowni Genetyki Molekularnej i Wirusologii
Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Ocena merytoryczna

Tematyka przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej dotyczy wyjaśnienia molekularnych mechanizmów leżących u podstaw procesu nowotorowego w nowotworach pochodzenia neuroektodermalnego, takich jak złośliwe nowotwory wieku dziecięcego *neuroblastoma* (nerwiak zarodkowy współczulny) oraz nowotwory wieku dojrzałego *melanoma* (czerniak). Wyjaśnienie tych złożonych procesów, mimo postępu wiedzy, ciągle pozostaje ogromnym wyzwaniem naukowym, a wkład w ich zrozumienie ma doniosłe znaczenie nie tylko poznawcze, ale potencjalnie aplikacyjne, pozwala bowiem wskazać nowe kluczowe białka jako punkty uchwytu leków w terapiach przeciwnowotworowych. Warto także zauważyć, że o ile obecnie zdecydowana większość istniejących chemioterapeutyków w leczeniu nowotworów to związki oddziałujące na patologicznie zmienione białka, obiecującą grupą stanowiącą potencjalnie innowacyjne cele terapeutyczne, a także biomarkery, są cząsteczki mikroRNA (miRNA). Niekodujące, krótkie cząsteczki miRNA regulują poziom transkryptów większości genów u człowieka w procesie znanym jako interferencja, powodując zahamowanie translacji lub degradację tego mRNA.

Praca doktorska mgr Iwony Nowak została wykonana pod kierunkiem prof. Hanny Rokity, której zespół z sukcesami bada złożone procesy nowotworzenia, ostatnio skupiając się na wyjaśnieniu mechanizmów molekularnych nowotworów pochodzenia neuroektodermalnego związanych z supresyjnym działaniem białka MCPIP1 (*monocyte chemotactic protein1-induced protein*), rybonukleazy uczestniczącej w wyciszaniu odpowiedzi immunologicznej. Zespół ten wykazał, że eksperymentalne podwyższenie poziomu MCPIP1 w komórkach linii *neuroblastoma* w hodowli *in vitro* skutkuje zahamowaniem cyklu komórkowego oraz zmianami w profilu ekspresji wielu onkogenów jak też mikroRNA (miRNA), m.in. znacznym obniżeniem poziomu miRNA-3613-3p. Mgr Iwona Nowak podjęła zatem badania, których celem było wyjaśnienie nieznanych dotąd funkcji negatywnie regulowanego przez białko MCPIP1 miRNA-3613-3p oraz zidentyfikowanie substratów samego białka MCPIP1 w komórkach *neuroblastoma*. Ponadto, doktorantka podjęła zadanie porównania roli białka MCPIP1 w innym typie nowotworu pochodzenia neuroektodermalnego, w czerniaku.

Badanie roli miRNA-3613-3p doktorantka rozpoczęła od poszukiwania metodami bioinformatycznymi, stosując takie algorytmy jak m.in. TargetScan i DIANA-microT, potencjalnych

docelowych transkryptów miRNA-3613-3p, związanych z patologią neuroblastoma. Następnie zweryfikowała eksperymentalnie wyniki poszukiwań *in silico*, transfekując komórki linii *neuroblastoma* BE(2)-C miRNA-3613-3p i badając, z zastosowaniem metod RT-qPCR i immunoblottingu, wpływ egzogennej nadekspresji tego miRNA na poziom wybranych docelowych transkryptów i kodowanych przez nie białek. Badania te wskazały na istotne statystycznie i zależne od zastosowanego w transfekcji stężenia miRNA-3613-3p obniżenie poziomu transkryptu i białka APAF1 (czynnik aktywujący peptydazę apoptotyczną 1). Zastosowano także test lucyferazy w celu zweryfikowania interakcji przewidywanych miejsc wiązania w miRNA-3613-3p i rejonie 3'UTR transkryptu APAF1, uzyskując jednak wynik negatywny. Podobnie negatywny był wynik badania wpływu nadekspresji miRNA-3613-3p na zawartość komórkową ATP jako wskaźnika żywotności komórek. Tym niemniej wykazano, że nadekspresja miRNA-3613-3p powoduje obniżenie poziomu aktywowanej proteolitycznie przez APAF1 kaspazy 9 i obniżenie poziomu kaspazy 7. Badania te pozwoliły zatem stwierdzić, że miRNA-3613-3p może hamować apoptozę, a tym samym wykazuje onkogeny potencjał w komórkach *neuroblastoma*, któremu przeciwdziałają supresorowe białko MCPIP1.

W drugiej części rozprawy Autorka skupiła się na badaniach funkcjonalnych samego białka MCPIP1 w komórkach *neuroblastoma*. Do najważniejszych odkryć w tej części pracy należą wyniki badania aktywności rybonukleazowej MCPIP1, skutkującej obniżeniem degradowanych przez MCPIP1 transkryptów. W badaniach tych wykorzystano *mi.in.* ekspresyjne wektory plazmidowe kodujące sekwencję MCPIP1 dzikiego typu (pcDNA3.1-MCPIP1wt) oraz sekwencję mutantu z punktową mutacją D141N w domenie rybonukleazowej, powodującej utratę aktywności katalitycznej (pcDNA3.1-MCPIP1-D141N). Porównując komórki z nadekspresją MCPIP1 typu dzikiego oraz mutantu stwierdzono, że aktywna rybonukleaza obniża poziom wytypowanych wcześniej do analizy transkryptów białek związanych z cyklem komórkowym i apoptozą, w tym zwłaszcza transkryptu genu *AURKA*. Gen ten koduje kinazę Aurora A, promującą progresję cyklu komórkowego i proces nowotworzenia. Następnie immunoprecypitacja RNA z wykorzystaniem wektora plazmidowego z sekwencją kodującą MCPIP1-D141 oraz z metką Flag (MCPIP1-D141-Flag) wykazała, że oddziaływanie rybonukleazy MCPIP1 i mRNA jest bezpośrednie. Ponadto, stosując test lucyferazy w komórkach *neuroblastoma* wykonano badania zależności struktura-funkcja białka stwierdzając, że MCPIP1 wiąże sekwencję znajdującą się w obrębie konserwatywnego fragmentu 3'UTR transkryptu *AURKA* oraz, że cały konserwowany ewolucyjnie rejon 3'UTR transkryptu *AURKA* jest konieczny do rozpoznania przez MCPIP1. Podsumowując, uzyskane wyniki dotyczące aktywności rybonukleazowej MCPIP1 przekonująco dokumentują hamujący wpływ tego białka na progresję cyklu komórkowego, a tym samym supresorowy charakter MCPIP1 w procesie nowotworowym.

Poza analizą aktywności rybonukleazowej, w pracy testowano także hipotezę, że w komórkach *neuroblastoma* białko MCPIP1 pełni rolę w deubikwitynacji niektórych białek szlaku sygnałowego NFκB. Jednak pomiary poziomu fosforylowanych białek tego szlaku nie potwierdziły tej hipotezy.

Opierając się na zdolności MCPIP1 do endonukleolitycznej degradacji RNA, w tym degradacji cząsteczek o strukturze spinki do włosów takich jak cząsteczki prekursorowych miRNA, podjęto też badanie wpływu egzogennej nadekspresji MCPIP1 typu dzikiego oraz mutantu MCPIP1-D141N na profil ekspresji miRNA w 2 liniach *neuroblastoma*. W pierwszym etapie tej analizy zastosowano metodę sekwencjonowania małych RNA. Mimo że w transfekowanych komórkach uzyskano wysoki wzrost poziomu MCPIP1 (8-10 krotny), sekwencjonowanie małych RNA z komórek linii KELLY nie doprowadziło do znalezienia różnic w profilu miRNA w porównaniu do komórek kontrolnych, transfekowanych pustym wektorem ekspresyjnym. Jednakże, znaleziono czternaście cząsteczek miRNA, których poziom różnicował komórki z nadekspresją MCPIP1 typu dzikiego od komórek z nadekspresją nieaktywnego katalitycznie mutantu MCPIP1. Niestety, kolejna analiza wybranych sześciu z czternastu miRNA,

przeprowadzona metodą RT-qPCR, nie potwierdziła tych różnic w przypadku większości z analizowanych miRNA, w obu liniach komórkowych. Pozytywną weryfikację wyników sekwencjonowania małych RNA w linii Kelly uzyskano jedynie dla miR-1260a.

Trzecim kierunkiem badań podjętych w pracy była analiza uniwersalności funkcji MCPIP1 w nowotworach neuroektodermalnych poprzez porównanie roli tego białka w komórkach *neuroblastoma* i *melanoma*. Na początku przeanalizowano ogólnodostępne dane z macierzy ekspresyjnych firmy Affymetrix na temat endogennej ekspresji genu kodującego MCPIP1 i innych genów z tej rodziny, jak też genu induktora białka MCPIP1 i jego receptorów, w guzach czerniaka oraz w komórkach prawidłowych. W komórkach złośliwych guzów czerniaka stwierdzono brak transkryptu *MCPIP1*, przy obecności mRNA innych genów z tej rodziny, co wskazywało na prawdopodobnie supresyjny charakter MCPIP1 w patogenezie tego nowotworu. Następnie ustalono, że poziom mRNA dla MCPIP1 w trzech liniach czerniaka jest zbliżony do jego poziomu w liniach *neuroblastoma*. Na tej podstawie przeprowadzono w jednej z linii czerniaka (MV3) badania analogiczne jak uprzednio wykonane w komórkach linii *neuroblastoma*, polegające na analizie wpływu egzogennej nadekspresji MCPIP1 na białka i szlaki sygnałowe związane z procesami nowotworzenia, a także na żywotność komórek i profil miRNA. Do najciekawszych z uzyskanych wyników należy wykazanie, że mimo że podwyższony poziom MCPIP1 nie skutkował zmianą poziomu ATP i tym samym prawdopodobnie żywotności komórek czerniaka, to jednak wiązał się ze znaczącym obniżeniem poziomu kilku transkryptów kodujących białka odpowiedzialne za progresję cyklu komórkowego, w tym, podobnie jak w komórkach *neuroblastoma*, transkryptu genu *AURKA* kodującego kinazę AURORA A. Obserwowane obniżenie poziomu transkryptów, jak też aktywnych form kodowanych przez nie białek, było zależne od aktywności rybonukleazowej MCPIP1, gdyż nie występowało w komórkach z nadekspresją nieaktywnego katalitycznie mutanta MCPIP1. Wykazano także, że zwiększony poziom MCPIP1 skutkuje obniżeniem poziomu białek mitogennego szlaku Akt/mTOR. Do ciekawych odkryć należy też stwierdzenie spadku poziomu miRNA-193a-5p. Natomiast, podobnie jak w komórkach *neuroblastoma*, w komórkach czerniaka nie stwierdzono wpływu MCPIP1 na szlak sygnałowy NFκB. Wyniki te wskazują na kilka podobnych aspektów aktywności rybonukleazy MCPIP1 w badanych nowotworach pochodzenia neuroektodermalnego.

Podsumowując, w pracy podjęto istotne i złożone zagadnienia naukowe. Zrealizowano je poprzez szeroko zakrojone, rzetelnie i konsekwentnie poprowadzone badania, które doprowadziły do sformułowania ważnych konkluzji. Uzyskane wyniki mają w większości nowatorski, oryginalny charakter, a także walory aplikacyjne, stanowią bowiem wkład w rozwój metod leczenia nowotworów pochodzenia neuroektodermalnego, takiego jak *neuroblastoma* i *melanoma*. Co ważne, rezultaty badań inspirują do formułowania kolejnych pytań, odkrywają zatem nowe horyzonty poznawcze. Uwagi krytyczne przedstawione zostały poniżej.

Ocena metodologiczna

Zakres doświadczalny pracy i warsztat metodyczny jest szeroki, dobór metod i narzędzi badawczych odpowiedni dla realizacji celu projektu i umiejętnie zastosowany. Warsztat badawczy obejmuje szeroką gamę różnorodnych technik biologii komórki, biologii molekularnej, biochemii i bioinformatyki, pozwalających na prowadzenie zaawansowanych badań nad funkcjami białek, jak też funkcjami stosunkowo niedawno odkrytej, nowej grupy cząsteczek regulatorowych takich jak miRNA. Metody te obejmują hodowle kilku linii *neuroblastoma* i *melanoma*, transfekcje komórek z wykorzystaniem wektorów plazmidowych, analizy typu RT-qPCR i immunoblotting, testy lucyferazy, immunoprecypitację RNA, a także techniki wysokoprzepustowe, takie jak sekwencjonowanie RNA. Dobór wszystkich testów i układów doświadczalnych jest przemyślany i dobrze uzasadniony, a badania zostały konsekwentnie

przeprowadzone. Można stwierdzić, że Pani Iwona Nowak posiada doskonałe i szerokie kompetencje eksperymentalne, co zapewnia Jej swobodę w podejmowaniu wymagających wyzwań naukowych.

Ocena formalnej i edytorskiej strony rozprawy

Rozprawa przygotowana jest zgodnie z obowiązującymi zasadami dotyczącymi prac doktorskich, które nie są zbiorem opublikowanych artykułów. Dysertacja liczy 164 strony. Po spisie treści zamieszczono wykaz stosowanych skrótów oraz *Wstęp* (19 stron), w którym zawarto dobrze wyselekcjonowane informacje naukowe, podane w odpowiedniej kolejności, a także zilustrowane trzema przejrzystymi rycinami. Autorka przedstawiła najpierw nowotwory pochodzenia neuroektodermalnego, w tym najważniejsze czynniki ryzyka i stosowane obecnie terapie. Następnie omówiono budowę i aktywności białka MCPIP1, a także jego regulacyjną rolę w wyciszaniu stanu zapalnego i supresji procesu nowotworowego. Wskazano też na szlaki sygnałowe regulujące poziom białka MCPIP1. Dalej we *Wstępie* znajdujemy opis biogenezy i funkcji miRNA, z uwzględnieniem udziału w patogenezie *neuroblastoma* i *melanoma*. *Wstęp* zawiera wyjaśnienie wszystkich przesłanek do podjętych zadań. Założenia i cele badań przedstawiono przejrzysto. Następujący dalej obszerny opis materiałów i metod (29 stron) umożliwia powtórzenie eksperymentów. Opis wyników, które przedstawiono na 54 stronach, stanowi lwią część rozprawy. Dyskusja zajmuje 16 stron. Rozdział ten obejmuje analizę znaczenia rezultatów pracy w odniesieniu do mechanizmów molekularnych nowotworzenia. Umiejętność prowadzenia takiej dyskusji jest ważnym kryterium dojrzałości naukowej. Spis piśmiennictwa jest obszerny, zawiera 277 pozycji. Publikacje zostały właściwie wyselekcjonowane. Na końcu zamieszczono streszczenia w języku polskim oraz w języku angielskim.

Proporcja poszczególnych części pracy jest odpowiednia. Rozprawa ma przejrzystą konstrukcję i w syntetyczny sposób dostarcza wszystkich informacji pozwalających na ocenę oryginalności i istotności rozwiązanego problemu naukowego, ogólnej wiedzy doktorantki w uprawianej dziedzinie naukowej i Jej umiejętności prowadzenia badań naukowych. Praca napisana jest w sposób zwięzły, a zarazem zrozumiale i ciekawie. Autorka posługuje się na ogół poprawnym, naukowym językiem. Uwagi dotyczące konstrukcji dysertacji oraz listę drobnych błędów językowych i edycyjnych, z obowiązku recenzenta, zamieszczam poniżej.

Uwagi merytoryczne

1. Omawiając we wstępie biogenezę i funkcje miRNA Autorka powołuje się na dość wczesne publikacje z lat 2004 – 2014 (cytacje 110-115). Zabrakło uwzględnienia najnowszych prac przeglądowych, takich jak np. publikacja Dawida Bartela „Metazoan microRNAs” opublikowana w renomowanym czasopiśmie Cell w 2018 r. (doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006). Prawdopodobnie także z tego powodu opis biogenezy miRNA jest dosyć ogólny i m.in. nie zawiera informacji o niekanonicznych szlakach biogenezy. Byłoby też wskazane, aby w rozdziale tym, w akapicie dotyczącym oddziaływań miRNA-mRNA znalazła się informacja na temat rejonu 3'UTR w mRNA (znajdujemy ją dopiero w *Wynikach* na str. 68.).
2. Omawiając udział miRNA w procesie nowotworzenia wskazano na ich potencjał biomarkerowy w przyszłej diagnostyce. Jednak cytowane publikacje (2006, 2014) są dość zamierzchłe jak na tak dynamicznie rozwijającą się dziedzinę badań.
3. Ponadto, wskazując we Wstępie na funkcje supresorowe miRNA lub onkogenne (onkomiry) należało wspomnieć, że te odkrycia obecnie są postrzegane i eksplorowane jako nowy horyzont przyszłych terapii nowotworów. Tej perspektywy zabrakło też w *Dyskusji*.
4. W badaniach poziomu miRNA-3631-3p metodą RT-qPCR w różnych liniach neuroblastoma zastosowano jako normalizator U6 SnRNA. Po pierwsze, nazwa „gen odniesienia” w opisie ryciny 6 jest nieprawidłowa, bo nie jest to gen. Ponadto, wybór cząsteczek referencyjnych i normalizacja poziomu

miRNA stanowi obecnie jedno z trudniejszych wyzwań metodycznych i wydają się być jedną z istotnych przyczyn braku powtarzalności wyników. O ile U6 SnRNA, który nie należy do klasy miRNA, jest stosowany jako normalizator dla analiz miRNA, zalecane jest stosowanie dodatkowo jako kontroli endogennych innych stabilnych cząsteczek miRNA. Ponadto wskazane jest też równoległe stosowanie kontroli egzogennych tzw. „spike in”.

5. Wybór typu komórek do badań: jedną z najbardziej powszechnie stosowanych linii *neuroblastoma*, tym samym najlepiej zbadanych, jest linia SH-SY5Y. Dlaczego tej linii nie uwzględniono w przeprowadzonych analizach?
6. Na rycinie 9 (B) blot dla aktywnej kaspazy 7 jest mało czytelny (str. 77).
7. W celu oceny żywotności komórek linii czerniaka z nadprodukcją MCPIP1 przeprowadzono pomiar komórkowej zawartości ATP przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu. Przestanką do tego eksperymentu były uzyskane wcześniej wyniki zahamowania proliferacji komórek linii *neuroblastoma* pod wpływem nadekspresji MCPIP1. Czemu wybrano właśnie ten test? Byłoby bardziej przekonujące oparcie wniosku o braku wpływu nadekspresji MCPIP1 na żywotność komórek na wynikach co najmniej dwóch testów żywotności. Testy te polegają na określaniu naturalnego stanu błony komórkowej lub mierzą stan metaboliczny komórki, m.in. powszechnie stosowanym jest test MTT, który umożliwia pomiar aktywności przemian energetycznych w mitochondriach. Ponadto, można byłoby ocenić poziom proliferacji lub profil cyklu komórkowego metodami cytometrii przepływowej.
8. Jakie mogą być przyczyny rozbieżności wyników profilowania miRNA w komórkach *neuroblastoma* linii KELLY z nadprodukcją białka MCPIP1wt i MCPIP1-D141N uzyskanych za pomocą sekwencjonowania małych RNA oraz za pomocą RT-qPCR? Nie znajdujemy w pracy komentarzy czy interpretacji sprzecznych lub niepotwierdzonych wyników, a szkoda.
9. Poza podobieństwami, niektóre uzyskane dane wskazują na różnice funkcji białka MCPIP1 w komórkach *neuroblastoma* i *melanoma*. W komórkach *melanoma* z nadekspresją MCPIP1 obniżeniu uległ poziom związanego z apoptozą transkryptu APAF1, podczas gdy w komórkach *neuroblastoma* obserwowano spadek poziomu miRNA3631-3p, co powinno skutkować zwiększonym poziomem mRNA dla APAF1.
10. Zamieszczone w rozdziale *Wyniki* ryciny i tabele stanowią odpowiednie przedstawienie wyników pracy. Natomiast ryciny we *Wstępie* potraktowane są nieco minimalistycznie, a całkowicie brak ich w rozdziale *Dyskusja*. Lekturę i analizę dysertacji ułatwiłoby zamieszczenie we *Wstępie* schematów omawianych szlaków sygnałowych oraz w *Dyskusji* syntetycznych schematów podsumowujących wyniki i zidentyfikowane funkcje białka MCPIP1 w szlakach sygnałowych w komórkach czerniaka oraz funkcje regulowanego przez białko MCPIP1 miRNA-3613-3p w komórkach *neuroblastoma*.
11. Dobrą praktyką, której zabrakło w niniejszej dysertacji jest zamieszczanie na końcu opisu wyników ich podsumowania w punktach, a na końcu *Dyskusji* wypunktowanie wniosków. Są to zwykle podsumowania bardziej szczegółowe, niż zawarte w streszczeniu.

Uwagi edycyjne i językowe

1. W tytule oraz treści podrozdziału 1.3. zastosowano rozłączną pisownię „mikro RNA”. Nie jest to właściwe, przedrostek „mikro” piszemy łącznie z rzeczownikiem (np. mikroelementy, mikroskop, mikrotom, mikroprzedsiębiorstwo, mikromanipulacje; Wielki Słownik PWN). W skróconej nazwie miRNA zastosowano już zresztą pisownię łączną.
2. Częstym błędem językowym, którego nie uniknęła Autorka, jest nierozróżnianie rzeczowników policzalnych i niepoliczalnych, np. transkrypty to policzalne cząsteczki, zatem liczba transkryptów, nie „ilość transkryptów” (np. str. 98, str. 105); w tym przypadku zresztą najwłaściwsze byłoby określenie „poziom transkryptów”; Podobnie nie ilość białka czy RNA (str. 116), ale raczej poziom lub stężenie

- białka; „liczba rodzajów tkanek” nie „ilość tkanek” (str. 98); antygeny występujące w dużej ilości ... powinno być „... w dużej liczbie...” (str. 15).
3. Jak wiadomo cząsteczki miRNA nie regulują bezpośrednio genów, lecz ich transkrypty (jest to epigenetyczna regulacja na poziomie potranslacyjnym). Dlatego dla ścisłości powinniśmy mówić o przewidywanych lub potwierdzonych „docelowych transkryptach”, nie docelowych genach (np. podpis ryciny 5, tekst str. 68).
 4. Odmiana terminu mimik i mimiki miRNA: słowo to powstało jako spolszczona wersja angielskiej nazwy *miRNA mimic*, zatem raczej ten mimik, nie ta mimik, w dopełniaczu mimików, nie mimik (jak tłumik, tłumików). Np. str. 40 „...a następnie dodano do hodowli komórkowej tak, aby końcowe stężenie mimik wyniosło 30 nM” raczej „...końcowe stężenie mimików..”
 5. RNA to kwas rybonukleinowy (rzeczownik rodzaju męskiego), zatem, nie „całkowite RNA” (str. 44), ale „całkowity RNA”
 6. Metoda to *Western blotting*, nie „western blot” (str. 54, tytuł rozdziału 3.7.3)
 7. Str. 35, niezręczne sformułowanie żargonowe „zastosowano pożywkę RPMI 1640 suplementowaną 10% FBS-em, ..” powinno być „... suplementowaną 10% roztworem FBS.”
 8. Materiały i metody: izolowanie RNA lub białka (proces), nie izolacja (np. izolacja społeczna)
 9. Nazwy anglojęzyczne zamiast polskojęzycznych, np. str. 36 „...przy użyciu roztworu Tripsin-EDTA, raczej „trypsina-EDTA”
 10. Drobne błędy konstrukcji zdań, np. str. 38, „ W celu skonstruowania wspomnianych wektorów zlecono firmie..” powinno być „Skonstruowanie wektorów zlecono firmie..”

Podsumowanie

Mimo kilku uwag krytycznych, których celem jest głównie zachęta do dalszej dyskusji, wysoko oceniam przedstawioną do oceny dysertację. Autorka podjęła się zadania znaczącego poznawczo i wymagającego metodycznie. Lektura dysertacji nie pozostawia wątpliwości, że mgr Iwona Nowak osiągnęła dużą sprawność eksperymentalną oraz zdobyła rozległą wiedzę i umiejętność krytycznej analizy danych, zatem wykazała dojrzałość umożliwiającą prowadzenie samodzielnych badań naukowych. Dysertacja wyróżnia się bardzo dobrą organizacją obszernego i wielowątkowego materiału, sprawnością przedstawienia i omówienia wyników oraz wnikliwością ich dyskusji w świetle istniejącej literatury. Stwierdzam, że rozprawa spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr. 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455). Z pełnym przekonaniem wnioskuję zatem do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Iwony Nowak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Ze względu na wysoką wartość merytoryczną wnioskuję jednocześnie o wyróżnienie przedstawionej rozprawy doktorskiej.



Prof. dr hab. Urszula Wojda