

Kraków, 30.06.2017



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

O C E N A

**Pracy doktorskiej mgr Aleksandry Marchwickiej,
doktorantki w Zakładzie Biotechnologii Białek
Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego**

Tytuł pracy:

"Regulacja receptora dla witaminy D (VDR) przez dwie ścieżki sygnałowe"

Poznanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za rozwój białaczek jest podstawą opracowania skutecznych, celowanych terapii, mogących przełamywać blokadę różnicowania oraz kontroli proliferacji i apoptozy komórek. Ważnymi białkami regulującymi różnicowanie i cykl komórkowy w czasie hematopoezy są receptory kwasu retinowego (RARs), należące do nadrodziny receptorów jądrowych. Jednym z przykładów wykorzystania wiedzy z zakresu biologii molekularnej w praktyce klinicznej jest zastosowanie kwasu all-trans retinowego (ATRA) w ostrych białaczkach promielocytowych charakteryzujących się translokacją t(15;17) i powstawaniem białka fuzyjnego RAR-PML. Badania komórek hodowanych *in vitro* oraz analizy wzrostu nowotworów indukowanych u zwierząt laboratoryjnych wskazują, że również 1,25-dihydroksy-witamina D₃ (1,25D₃) wiążąc się do receptora jądrowego VDR może hamować cykl komórkowy i indukować program różnicowania komórek nowotworowych. Badania epidemiologiczne także wskazują na związek między poziomem 1,25D₃ a rozwojem nowotworów. Pochodne 1,25D₃ mogące aktywować VDR, a jednocześnie mające obniżony potencjał kalcemiczny, są uważane za potencjalnie wartościowe leki w terapiach przeciwnowotworowych, zwłaszcza w kombinacji z innymi lekami.

Wiadomo, że szlaki zależne od VDR i RAR są od siebie zależne. Szczegóły tych interakcji nie są jednak jasne, a przy tym prawdopodobnie odmienne w różnych liniach komórkowych. Zrozumienie zasad wzajemnej regulacji oraz

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>

wyjaśnienie mechanizmów ich specyficzności komórkowej jest kluczowe dla projektowania terapii z wykorzystaniem ligandów RAR i VDR. Zagadnienie to stało się tematem rozprawy doktorskiej pani mgr Aleksandry Marchwickiej.

Głównym zadaniem Doktorantki było określenie czy receptory kwasu retinowego regulują transkrypcję genu kodującego VDR. Celem pracy było przede wszystkim wskazanie który z receptorów (RAR α , RAR β czy RAR γ) jest odpowiedzialny za taką regulację oraz czy regulacja ta prowadzi do zahamowania czy nasilenie aktywności szlaku zależnego od VDR. Doktorantka zamierzała również sprawdzić jakie inne szlaki mogą regulować ekspresję VDR. Pani mgr Aleksandra Marchwicka skupiła się na regulacji RAR i VDR w komórkach linii białaczkowych, uwzględniając zarówno poziom ekspresji badanych genów jak i wpływ aktywacji kodowanych przez nie białek na ekspresję markerów różnicowania mieloidalnego. Temat pracy jest więc interesujący i może stanowić punkt wyjścia do planowania badań nad możliwością wykorzystania 1,25D3 w indukcji różnicowania komórek białaczkowych.

Realizacja projektu wymagała zastosowania przez Doktorantkę klasycznych technik biologii komórki. Zestaw metod wykorzystywanych w badaniach był niewielki i ograniczał się do analizy ekspresji genów na poziomie mRNA (qRT-PCR) oraz białka (western blotting z frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej komórek oraz podstawowa analiza cytometryczna pojedynczych antygenów powierzchniowych). Dzięki dobremu zaplanowaniu doświadczeń i zastosowaniu specyficznych agonistów badanych receptorów oraz specyficznego wyciszenia genów za pomocą sekwencji shRNA (wprowadzanych wektorami plazmidowymi lub lentiwirusowymi) można było uzyskać wiarygodną odpowiedź na postawione w pracy pytania.

Badania przeprowadzone zostały przez Doktorantkę z wykorzystaniem kilku linii komórkowych: ostrej białaczki erytroidalnej M5 (KG1), ostrej białaczki promielocytowej M2 (HL60) i M3 (NB-4), ostrej białaczki monocytowej M5a (MOLM-13 i NOMO-1) oraz chłoniaka histocytnego (U937). Komórki hodowane były w standardowych warunkach.

Najważniejsze, moim zdaniem, wyniki uzyskane przez Doktorantkę to i) wykazanie, że ATRA wpływa na ekspresję VDR głównie poprzez receptor RAR α a sekwencja regulatorowa odpowiedzialna za ten wpływ zlokalizowana jest w



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6411
+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicia.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>

promotorze 1a między -1935 bp a -464 bp od miejsca startu transkrypcji, ii) wykazanie że warianty transkrypcyjne VDR wrażliwe na regulację przez ATRA to VDR 1a i 1g, oraz iii) wykazanie roli genu fuzyjnego FGFR1OP2-FGFR1 w indukcji niewrażliwości komórek KG1 na 1,25D3.

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Marchwickiej liczy 189 stron maszynopisu, w tym 57 rysunków i fotografii oraz 20 tabel. Cytowane piśmiennictwo to 443 pozycje. Praca zbudowana jest w sposób klasyczny i obejmuje: Streszczenie, angielski Abstract, Wstęp, osobny rozdział przedstawiający Hipotezę i Cele Badawcze, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję i wyodrębnione w osobny rozdział Wnioski. Całość poprzedzona jest Spisem Treści i Wykazem Skrótów, a zakończona Spisem Rysunków, Spisem Tabel, Wykazem Publikacji Doktorantki oraz Bibliografią. Zarówno kompozycja pracy jak i zawartość poszczególnych części są prawidłowe, a Spis Treści oraz Wykaz Skrótów są dobrze przygotowane i ułatwiają lekturę pracy. W spisie skrótów wkradło się kilka błędów literowych (np. w słowie "inositol") czy edytorskich (np. transtyretyna zarówno jako nazwa polska jak i angielska), ale nie mają one znaczenia merytorycznego. Błędnie natomiast określone są komórki CLP i CMP – progenitory linii limfoidalnej i mieloidalnej nie są komórkami pluripotencjalnymi, podobnie HSC – hematopoetyczne komórki macierzyste są komórkami multipotencjalnymi, nie pluripotencjalnymi.

Streszczenie jest napisane poprawnie, choć ma nieco zaburzone proporcje – zbyt długa jest część wstępna, nie ma natomiast informacji o metodyce. Niemniej Streszczenie (podobnie jak angielski Abstract) przedstawia wnioski z najważniejszych doświadczeń i dobrze podsumowuje pracę. Warto jednak zauważyć, że cele pracy wspomniane w Streszczeniu, choć odpowiadają informacjom uzyskanym w wyniku badań, nie są tożsame z celami przedstawionymi w głównej części pracy (w Streszczeniu podkreślone jest poszukiwanie przyczyn oporności komórek na 1,25D3).

Liczący 47 stron Wstęp jest prawidłowo skomponowany i napisany ciekawie, choć moim zdaniem jest zbyt obszerny i zbyt mało selektywny. Część informacji nie jest bezpośrednio związana z tematem pracy i może sugerować znacznie szerzej zaplanowane badania. Niemniej Wstęp dostarcza wielu istotnych wiadomości i dobrze świadczy o znajomości tematu przez Doktorantkę. Rozpoczyna się od opisu mielopojezy, koncentrując się nie tyle



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

na procesie, co na cytokinach i czynnikach transkrypcyjnych które go regulują. Sporo uwagi poświęca Doktorantka ostrym białaczkom szpikowym, omawiając ich klasyfikację, patogenezę i najczęściej występujące mutacje. Kolejnym poruszonym we Wstępie tematem są receptory jądrowe, zwłaszcza te bezpośrednio związane z hematopoezą i białaczkami – RAR i VDR. Ich opis jest ściśle związany z tematem badań. Zwrócenie przez Doktorantkę uwagi na kontrowersje i niejasności wynikające z odmiennych wyników publikowanych przez różne zespoły dobrze uzasadnia celowość podejmowania dalszych prac. Ostatnia część Wstępu poświęcona jest terapii indukującej różnicowanie komórek nowotworowych.

Wstęp napisany jest komunikatywnym językiem, choć zawiera sporo powtórzeń i zyskałby na skondensowaniu stylu. Lepiej unikać zdań takich jak na str. 13, informujących że "rozwój z komórki o potencjale do tworzenia wszystkich rodzajów komórek krwi do komórki o ograniczonym potencjale aż do komórki zróżnicowanej, związany jest ze stopniową utratą potencjału do różnicowania" bo to dwukrotne powtórzenie tej samej informacji innymi słowami. Niektóre fragmenty są bardzo ogólnikowe i moim zdaniem zbyt uproszczone. Mogą sugerować regulację opisywanych aktywności przez pojedyncze cytokiny (np. sprowadzenie regulacji cyklu komórkowego HSC do działania TGF β i TNF α) lub zawierają informacje niespójne, jak np. na str. 15, że białko c/EBP α związane jest z blokadą proliferacji i różnicowania w kierunku granulocytów, a na str. 16, że c/EBP α prowadzi do różnicowania linii granulocytarnej. Być może wynika to z błędu stylistycznego w pierwszym zdaniu, niemniej korekta Wstępu połączona z wyborem bardziej precyzyjnego stylu byłaby korzystna. Są też jednak fragmenty bardzo dobrze napisane, porządkujące wiedzę (np. opis czynników transkrypcyjnych regulujących mielopoezę, opis mutacji kinaz tyrozynowym w białaczkach czy też opis struktury i funkcji VDR). Wstęp ilustrowany jest przejrzystymi schematami, ułatwiającymi lekturę. Opisy rycin są jasne i dokładne, z prawidłowymi odnośnikami do prac źródłowych.

Zdarzają się we Wstępie błędy stylistyczne, wynikające głównie z dosłownego tłumaczenia tekstu i zachowania składni angielskiej. Zbyt często moim zdaniem stosowany jest też zwrot "ostatnie badania wskazują", gdyż cytowane prace pochodzą czasem sprzed ponad 10 lat (np. na str. 29 "ostatnie

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>

doniesienia" odnoszą się do pracy z 1992 roku). Są to jednak uchybienia o charakterze edytorskim, nie mające wpływu na wartość merytoryczną tekstu.

Pod względem merytorycznym Wstęp napisany jest prawidłowo i świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki. Niemniej powieła on błędne określanie hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych jako komórek pluripotencjalnych. Niektóre stwierdzenia wydają mi się też zbyt mocne – np. że receptor jądrowy przy braku liganda związany jest z korepresorami (str. 37). To prawda, ale nie dla wszystkich receptorów jądrowych. Nie nazywałabym również ciałek jądrowych organellami (str. 54). Generalnie jednak interpretacja prezentowanych prac jest ostrożna i prawidłowa, a Wstęp dobrze wprowadza do tematyki badań i uzasadnia ich podjęcie. Cele pracy wyodrębnione w osobny rozdział są jasno sformułowane, z zaznaczeniem głównego zagadnienia i szczegółowych pytań na która Doktorantka chce odpowiedzieć.

Doktorantka na 21 stronach opisuje metody stosowane w pracy. Opisy te są prawidłowe i dokładne, w pełni wystarczające do powtórzenia przeprowadzonych doświadczeń. Na uznanie zasługuje bardzo dokładny opis wykorzystywanych linii komórkowych, z uwzględnieniem występujących w nich mutacji. Brakuje mi natomiast informacji o liczbie powtórzeń niezależnych doświadczeń. Takie dane powinny się znaleźć albo w ogólnym opisie metodyki, albo w opisie rycin. Mam jedynie dwie drobne uwagi dotyczące opisu przedstawionych metod:

- Przy opisie określania żywotności komórek chodziło o roztwór błękitu trypanu a nie o roztwór trypanu (str. 73).

- Nie ma informacji które białko HDAC (str. 77) było wykorzystywane jako kontrola czystości frakcji jądrowej. To istotne, bo niektóre białka HDAC mogą być usuwane z jądra do cytoplazmy, np. w odpowiedzi na stres oksydacyjny.

Wyniki (zajmujące 42 strony) są szczegółowo opisane i zilustrowane odpowiednimi wykresami oraz zdjęciami. Co ważne, Doktorantka dąży do opisanie doświadczeń tak, by widać było logiczne związki między kolejnymi etapami prac i cel ten udaje jej się osiągnąć. Moim zdaniem bardzo dobrym pomysłem jest krótkie wprowadzanie w temat przed opisem doświadczenia. Z jednej strony może to być uznane za umieszczanie elementów Dyskusji w



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicia.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

Wynikach, z drugiej jednak ułatwia śledzenie toku rozumowania Autorki i zasadność kolejnych kroków. Przy wieloetapowych badaniach taki sposób prezentacji jest prawidłowy. Warto podkreślić, że Doktorantka wyraźnie zaznacza, które analizy wykonywane były z pomocą innych osób.

Pierwsza część opisu Wyników dotyczy badań regulacji VDR przez retinoidy i 1,25D3. W badaniach analizowano ekspresję genu na poziomie mRNA i białka. W przypadku analiz czynników transkrypcyjnych to może nie być wystarczające. Zastanawiam się dlaczego Doktorantka nie zdecydowała się na zastosowanie wektorów reporterowych regulowanych przez sekwencję wiążącą VDR, ewentualnie testu EMSA. Niemniej wnioskowanie na temat aktywności transkrypcyjnej na podstawie ekspresji dobrze dobranego, regulowanego przez VDR genu targetowego jest metodą pośrednią, ale racjonalną. Wyniki są opisane jasno i przekonująco. Mam jedynie kilka uwag i pytań dotyczących tej części pracy:

- Na rycinie 20B, pokazana jest analiza western blot dla VDR we frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej. Białkiem referencyjnym jest aktyna, a sygnał dla aktyny z jądra i cytoplazmy jest zbliżony. Jaka była czystość frakcji jądrowej? Czy na podstawie przedstawionych wyników (Ryc. 20B i Ryc. 21) można sugerować na czym polega regulacja białka VDR przez 1,25D3?

- Podobnie na Ryc. 28 jedynym białkiem kontrolnym jest aktyna, choć tu sygnał z aktyny we frakcji jądrowej jest znacznie słabszy. Lepiej byłoby dodawać zawsze np. laminę jako białko charakterystyczne dla frakcji jądrowej, tak jak na Ryc. 34B, przy czym jakość niektórych przedstawionych żeli (np. 34B – RAR α czy 35C – lamina) jest słaba.

- Wybór markerów powierzchniowych wskazujących na różnicowanie w kierunku monocytów (CD14) i granulocytów (CD11b), zwłaszcza przy analizie pojedynczych antygenów, jest dyskusyjny. Bardzo proszę Doktorantkę o jego uzasadnienie.

- Doktorantka pisze, że poziom CD14 (a raczej procent komórek wykazujących ekspresję CD14) jest obniżony w komórkach NOMO-1 traktowanych 1,25D3 i ATRA w porównaniu do tych traktowanych jedynie 1,25D3 (Ryc. 24E). Taki wniosek wydaje mi się zbyt mocny.

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

- Mam wątpliwości co do możliwości interpretacji danych przedstawionych na Ryc. 26 (zwłaszcza dotyczących linii KG1). Bardzo duże SEM sugerują problemy techniczne przy wykonywaniu doświadczeń lub analiz.

- Ryc. 35A wskazuje, że wyciszenie ekspresji RAR α w komórkach KG1 prowadzi do wzrostu ekspresji VDR. Wzrost ekspresji jest też wywoływany podaniem liganda RAR – ATRA. Jak zdaniem Doktorantki można to interpretować?

- Doktorantka wspomina, że w komórkach HL60 z wyciszoną ekspresją VDR wzrost frakcji komórek wykazujących ekspresję powierzchniową CD14 w odpowiedzi na 1,25D3 jest niższy o 11% niż w przypadku linii z normalnym poziomem VDR. Czy taka różnica może być zdaniem Autorki istotna biologicznie? Która informacja o istotności statystycznej jest prawdziwa – ta podana w Wynikach ($p=0.0066$, str. 109) czy w Dyskusji (brak istotności, str. 132)?

- Częściej stosuje się nazwę świetlik niż robaczek świętojański na określenie rodzaju Photinus z którego pochodzi lucyferaza używana w doświadczeniach.

W drugiej części Wyników Doktorantka opisuje regulację genu VDR w komórkach KG1 transfekowanych plazmidami w celu wyciszenia RARA. Nie udało się uzyskać prawidłowego narzędzia do analizy wpływu RARA w komórkach KG1, gdyż wiele badanych parametrów zmieniało się podobnie w linii z wyciszoną ekspresją RARA i transfekowanej plazmidem linii kontrolnej, wyraźnie wskazując na efekt procedury a nie wprowadzonej sekwencji. Stosowana w niektórych doświadczeniach przez Doktorantkę kontrola "ratunkowa" z komórek transdukowanych wektorami lentiwirusowymi nie jest moim zdaniem prawidłowa i nie uważałabym interpretacji takich wyników za wiarygodną. Bardzo podoba mi się natomiast konsekwencja Doktorantki w próbie zrozumienia przyczyny nieoczekiwanego efektu transfekcji. Dzięki tej dociekliwości okazało się, że uzyskano bardzo dobre narzędzie do zbadania roli genu fuzyjnego FGFR1OP2-FGFR1 (mutacji charakterystycznej dla linii KG1). W konsekwencji możliwe było wykazanie, że inaktywacja genu fuzyjnego przywraca wrażliwość linii KG1 na 1,25D3, co wydaje mi się jednym z ciekawszych uzyskanych wyników. W związku z tą częścią pracy mam tylko jedną uwagę: Doktorantka pisze, że badała czy podwyższony poziom VDR

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>

wynika ze zwiększonej translacji lub stabilności białka (str. 115). Podobne stwierdzenie pojawia się w dyskusji (str. 134). Prezentowana jest jednak jedynie analiza ekspresji VDR na poziomie mRNA ze standardowych hodowli. Takie dane nie dają informacji na temat poziomu translacji, stabilności transkryptu czy stabilności białka. Proszę o komentarz.

Dyskusja jest stosunkowo krótka, zajmuje 14 stron i skupia się przede wszystkim na podsumowaniu uzyskanych wyników oraz ich omówieniu w świetle wcześniej opublikowanych prac. Porządkuje uzyskane dane i podkreśla najważniejsze wnioski. Jest dobrze i przekonująco napisana, ilustrowana dobrymi schematami. Niektóre stwierdzenia wydają mi się nieco zbyt mocne, ale mimo to Dyskusja nie staje się zbyt spekulatywna. Doktorantka pisze między innymi, że wszystkie wcześniej omówione badania ("wszystkie te badania", str. 125) sugerują negatywny wpływ 1,25D3 na indukowane przez ATRA różnicowanie granulocytarne. Kilka zdań wcześniej pisze jednak, że wyniki analiz przedstawiane w różnych pracach wskazują na synergizm, addycję, brak efektu lub antagonizm 1,25D3 i ATRA. Być może niespójność jest efektem błędu stylistycznego. Wydaje mi się też, że określenie nadrzędnego celu prowadzonych prac (str. 126) jako zbadanie mechanizmu regulacji VDR przez receptory RAR jest zbyt ambitne, gdyż badania nie były zaprojektowane na zrozumienie podstaw molekularnych poszczególnych etapów regulacji, a raczej na wskazanie regulowanych szlaków lub potwierdzenie bezpośredniego wpływu na poziom ekspresji. Lepsze jest sformułowanie celów w podrozdziale Hipoteza i Cele Badawcze. W dyskusji wkradło się też błędne odniesienie do ryciny 22 (str. 126), która dotyczy ATRA a nie 1,25D3.

Wnioski sformułowane są jasno, precyzyjnie i znajdują potwierdzenie w wynikach doświadczeń. Byłabym jedynie ostrożna w jednoznacznym interpretowaniu wyników uzyskanych z komórek bez stymulacji ATRA jako efektów działania RAR niezwiązanego z ligandem. Trudno bowiem całkowicie wykluczyć obecność ligandów lub ich substratów w hodowli, zwłaszcza przy zastosowaniu 10% FBS.

Praca pod względem edytorskim przygotowana jest dobrze, zawiera bardzo niewiele błędów literowych i nieco więcej interpunkcyjnych. Pojawiające się niezręczności stylistyczne typu "zmiana ekspresji nie uległa zmianie" są dość częste, ale poza nielicznymi wyjątkami nie wpływają na



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>

zrozumienie tekstu i w żaden sposób nie zmieniają wartości merytorycznej pracy.

Podsumowując, badania opisane przez Doktorantkę dotyczą bardzo ciekawych zagadnień. Dzięki wykorzystaniu dobrze zaplanowanych układów doświadczalnych pozwoliły na wyciągnięcie wartościowych i wiarygodnych wniosków, mimo wykorzystywania stosunkowo wąskiego zestawu metod analitycznych. Uważam, że Doktorantka prawidłowo zrealizowała założone cele badawcze i stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi rozprawy doktorskiej. W związku z tym proszę wysoką radę Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie pani mgr Aleksandry Marchwickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

Alicja Józkowicz



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicia.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>