

prof. dr hab. Jacek Jaworski  
Pracownia Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej  
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej  
Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa

Warszawa, 27 lutego 2023 r.

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Ewy Justyny Mrówczyńskiej, pt. „Wpływ żelsoliny, nieintegrynowego receptora lamininy oraz kinazy zależnej od integryny na rozwój obwodowego układu nerwowego zarodka kurzego”.**

**Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie**

Przedmiotem rozprawy pani mgr Ewy Mrówczyńskiej było, jak napisano w tytule, określenie funkcji 3 białek – żelsoliny (GSN), nieintegrynowego receptora lamininy (LamR) oraz kinazy zależnej od integryny (ILK) na rozwój obwodowego układu nerwowego. Jako model badawczy posłużyły Doktorantce rozwijające się zarodki kurze i pochodzące z nich hodowle tkankowe, i komórkowe. W szczególności pani mgr Ewa Mrówczyńska skupiła się na relatywnie wczesnych etapach rozwoju, kiedy dochodzi do migracji komórek grzebienia nerwowego prowadzącej do tworzenia zwojów nerwowych i obwodów neuronalnych, jak również różnicowania innych typów komórek m.in. komórek Schwanna oraz melanocytów. Nie ma wątpliwości, iż są to procesy kluczowe dla powstawania i prawidłowego funkcjonowania kręgowców. Znajomość złożonego molekularnego podłoża tych etapów rozwojowych jest nie tylko fascynująca poznawczo, ale również przyczynia się do lepszego rozumienia podłoża chorób układu nerwowego, jak też nowotworzenia. Jednymi z najważniejszych aspektów migracji komórek i ich różnicowania są zdolność komórek do adhezji do podłoża oraz współregulacja tego procesu z dynamiką cytoszkieletu. Warto podkreślić, iż pomimo intensywnych badań nad tymi procesami, w zróżnicowanych układach modelowych, wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. To stanowiło motywację Doktorantki do podjęcia prac, które w mojej ocenie można zaliczyć do bardzo ciekawych i kluczowych dla pełnego opisu procesu powstawania obwodowego układu nerwowego. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń, pani mgr Ewa Mrówczyńska po raz pierwszy opisała, iż w trakcie rozwoju zarodka kurzego GSN, LamR i ILK mogą uczestniczyć, w odpowiedzi na lamininę, w regulacji kolejnych etapów rozwoju układu nerwowego, w tym zarówno w migracji, jak i różnicowaniu badanych przez nią komórek. Ponieważ, dotychczas, podobne badania porównawcze nie były podejmowane w sposób tak kompleksowy, przedstawioną mi do oceny pracę należy uznać za nowatorską i o potencjalnie istotnym znaczeniu dla rozwoju wiedzy z zakresu neurobiologii rozwoju.

**Formalny opis rozprawy**

Rozprawa licząca 232 strony maszynopisu ma układ typowy. Rozpoczynają ją spis treści, wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, oraz dość obszerny liczący 42 strony Wstęp, zawierający 6 głównych podrozdziałów, które wprowadzają czytelnika w tematykę prowadzonych badań. Po Wstępie, Doktorantka opisała Założenia i Cel swojej pracy doktorskiej. Po nim następuje wyczerpujący, ponad 50 stronicowy, opis

materiałów i metod, podzielony na 29 głównych podrozdziałów. Wyniki, liczące 78 stron podzielone zostały na 9 głównych podrozdziałów, które bardziej szczegółowo omawiam poniżej w ocenie merytorycznej rozprawy. Po Wynikach następuje 24 stronicowa Dyskusja, podzielona na 3 podrozdziały poświęcone odpowiednio każdemu z badanych białek. Po Dyskusji zamieszczono kolejno Wnioski, Podziękowania, Spis Rycin (67), Tabel (28) i Równań, oraz imponującą Bibliografię, liczącą 427 pozycji.

## Ocena merytoryczna

**Wstęp** ocenianej rozprawy jest obszerny i omówione w nim zostały wszystkie zagadnienia konieczne dla zrozumienia tematyki i celów rozprawy. Pierwsza część Wstępu jest poświęcona opisowi grzebienia nerwowego i formujących go komórek oraz ich dalszych losów w trakcie rozwoju. Kolejno Doktorantka omawia macierz zewnątrzkomórkową, kluczową rolę lamininy w tej strukturze oraz receptory, z którymi się wiąże. Czwarty podrozdział Wstępu jest poświęcony takim zagadnieniom jak ruch komórek, ich adhezja oraz kontrybucji aktyny i jej dynamiki do tych procesów. W tym podrozdziale omówiono także bardziej specyficzne dla niniejszej rozprawy zagadnienia, jak procesy delaminacji i migracji komórek grzebienia nerwowego. W 5 podrozdziale Wstępu Doktorantka omawia choroby związane z dysfunkcją komórek wywodzących się z grzebienia nerwowego. Na koniec Wstępu mgr Ewa Mrówczyńska wyczerpująco przedstawiła informacje na temat badanych przez nią białek, czyli GSN, LamR i ILK. Lektura Wstępu nie tylko bardzo dobrze wprowadza w tematykę rozprawy doktorskiej, ale też udowadnia rozległą wiedzę Doktorantki na temat rozwoju obwodowego układu nerwowego i towarzyszących mu zjawisk na poziomie molekularnym. Zasadniczo do Wstępu nie mam poważnych uwag, niemniej znalazłem pojedyncze stwierdzenia, które wymagałyby poprawy lub uściślenia. Na przykład na str. 40 Doktorantka stwierdza, że: *„Szybka reakcja stożka wzrostu na otaczające środowisko możliwa jest dzięki kontroli transkrypcji, produkcji białek czy proteolizy białek a także ruchowi w obrębie obrzeża komórki.”* To zdanie uwidacznia kilka problemów. Po pierwsze, nie jest dla mnie jasne, jak kontrola transkrypcji zachodząca w jądrze komórkowym, często milimetry od wzrastającego stożka, miałaby pozwalać na jego szybką reakcję. Natomiast zabrakło w tym zdaniu informacji o zmianie lokalnych stężeń wapnia i poziomu cAMP, które w istocie stanowią główny mechanizm szybkich reakcji stożka wzrostu. W końcu, nie wiadomo o jaki ruch na obrzeżach komórki chodzi Doktorantce. Z kolei, w następnym zdaniu Doktorantka stwierdza, iż *„czynniki istotne dla ruchu neurytu”* są transportowane *„z ciała komórki do stożka wzrostu za pomocą endosomów oraz białek motorycznych (kinezyn i dyneiny)”*. Chciałbym zwrócić uwagę, iż cechą charakterystyczną aksonów jest, że dyneina transportuje w nich ładunek do a nie od ciała komórki, zgodnie z resztą z ryciną 8, w związku z czym przytoczone zdanie zawiera błąd. Kolejne stwierdzenie, co do którego prawidłowości mam wątpliwości znalazłem na str. 53. Doktorantka pisze, że *„LamR lokalizuje się w jądrze komórkowym, gdzie bierze udział w inicjacji translacji”*. Być może jest to skrót myślowy, ale o ile mi wiadomo inicjacja translacji zachodzi w cytoplazmie a nie w jądrze komórkowym. Ciekawym zabiegiem zastosowanym we Wstępie jest przedstawienie danych wstępnych uzyskanych przez zespół, w którym pracowała Doktorantka, które pozwoliły na postawienie

przez nią pewnych hipotez badawczych. Jednak, w niektórych przypadkach (np. Ryc. 10 czy Ryc. 13) brak jest w związku z tym opisu zastosowanych metod, analiz liczbowych czy kontroli negatywnych, tak krytycznych w przypadku takich technik, jak PLA czy *in situ* hybrydyzacja. To nie pozwala ocenić na ile wiarygodne były przesłanki podjęcia niektórych badań. Być może dobrym rozwiązaniem byłoby dołączenie pełnej dokumentacji jako załącznika.

**Cele rozprawy.** Jako główny cel pracy Doktorantka postawiła sobie „ustalenie czy białka *GSN*, *LamR* oraz *ILK* pełnią istotne role w rozwoju obwodowego układu nerwowego podczas rozwoju zarodkowego kury”. Aby osiągnąć cel główny pani mgr Ewa Mrówczyńska sformułowała 5 celów szczegółowych. W mojej ocenie zarówno cel główny, jak i cele szczegółowe zostały określone trafnie, i w sposób umożliwiający uzyskanie konkluzyjnych wyników badań, oczywiście pod warunkiem wykorzystania właściwego podejścia eksperymentalnego.

**Materiały i Metody.** W mojej ocenie, w przeważającej większości materiały i metody wykorzystane w ocenianej rozprawie zostały opisane w sposób wystarczający do powtórzenia wykonanych procedur przez osoby dysponujące odpowiednim doświadczeniem i umiejętnościami. Z drobnych uwag krytycznych zwróciłbym uwagę, iż podawanie objętości roztworu DNA wykorzystanego w procedurze bez podania jego stężenia (str. 102), czy wartości OD bez podania długości fali (str. 95), nie jest zbyt informatywne dla osób nie będących autorką rozprawy. Dodatkowo zabrakło mi następujących informacji:

(i) czy RNA przed reakcją odwrotnej transkrypcji traktowano DNazą lub też czy sondy zaprojektowano, tak aby nie było możliwe namnożenie produktu na bazie zanieczyszczeń DNA;

(ii) w jaki sposób projektowano wykorzystane w pracy sh i scRNAmirs. Czy były to sekwencje już wcześniej w literaturze opisane czy zaprojektowane? Jeśli to drugie, to przy użyciu jakich programów komputerowych i parametrów granicznych? Oraz jakie przeprowadzono kontrole w celu upewnienia się, iż zaprojektowane odczynniki działały w sposób specyficzny?

Pomimo jednak tych drobnych uwag muszę przyznać, że zakres stosowanych w pracy technik, w tym bardzo złożonych (np. *in situ* hybrydyzacja) i wymagających ponadprzeciętnych zdolności manualnych (elektroporacja *in ovo*, różnorodne hodowle tkankowe i komórkowe) budzą podziw. Również na podkreślenie zasługuje kreatywność Doktorantki w zastosowaniu optymalnych metod analizy obrazów mikroskopowych do opisu ilościowego badanych zjawisk.

**Wyniki.** W pierwszej części wyników (Rozdział 4.1) Doktorantka, przy użyciu takich technik jak Western blot, odwrotna transkrypcja połączona z reakcją PCR oraz hybrydyzacją *in situ* oceniła w trakcie rozwoju zarodka kurzego poziom i przestrzenną dystrybucję ekspresji genu *RPSA* (kodującego *LamR*) oraz *ILK*. Było to konieczne ze względu na to, iż dotychczas w literaturze wyniki takich badań nie były opisane. W efekcie mgr Ewa Mrówczyńska

potwierdziła występowanie LamR i ILK w trakcie rozwoju zarodkowego kury, w szczególności w regionach będących pochodnymi komórek grzebienia nerwowego. Konkluzje tej części nie budzą w mojej ocenie wątpliwości, choć uważam, że użycie metody ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR) pozwoliłoby na dokładniejsze określenie względnych różnic w poziomie badanych transkryptów.

W rozdziale 4.2 Doktorantka przystąpiła do oceny wpływu wyciszenia ekspresji *RPSA*, *ILK* i *GSN* na migrację komórek grzebienia nerwowego. W mojej ocenie jest to jedna z najbardziej zaawansowanych i wymagających technicznie części rozprawy doktorskiej, w której wykorzystano wyciszenie ekspresji badanych genów *in ovo*, przy użyciu shmirów wprowadzanych do komórek poprzez elektroporację. W efekcie wykazano, iż elektroporacja shmir, ale nie scmir (kontrola) skierowanych przeciwko *RPSA* (LamR) skutkowało znaczącym spadkiem liczby komórek wymigrowujących z grzbietowej części cewy nerwowej. Natomiast sh*RPSA* nie miało wpływu na przebieg samej migracji, czy rozwój całego zarodka. W przypadku analogicznych doświadczeń przeprowadzonych z wykorzystaniem sh*ILK*, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w porównaniu do kontroli, w żadnym z badanych parametrów, choć wydaje się, że pewne tendencje można było zaobserwować (np. w przypadku GFP-pozytywnych komórek zwoju współczulnego). W końcu w przypadku sh*GSN*, zaobserwowano tendencję do mniejszej liczby komórek, wymigrowujących z grzebienia nerwowego, ale nie osiągnęła ona istotności statystycznej, najprawdopodobniej w związku z dużym rozrzutem wyników w wariancie kontrolnym. Jednocześnie zaobserwowano słabszą migrację komórek z ekspresją sh*GSN*. W efekcie przeprowadzonych doświadczeń Doktorantka skonkludowała, iż wyciszenie *RPSA* prowadziło do zaburzenia delaminacji komórek grzebienia nerwowego, a z kolei wyciszenie *GSN* zakłócało prawidłową migrację komórek. Z kolei, wyciszenie *ILK* nie miało żadnego wpływu. W tym miejscu, narzuca się pytanie, czy w przeprowadzonych eksperymentach upewniono się, że wprowadzenie użytych shRNA istotnie doprowadziło do znaczącego obniżenia ekspresji badanych genów oraz, że scRNA takiego efektu nie miały. W moim przekonaniu, bez wykonania takich badań, nie można jednoznacznie wyciągnąć wniosków zawartych w rozprawie. Po pierwsze, shRNA czy też shmiry jako narzędzie generują potencjalnie liczne efekty tzw. off-target. Co więcej, odpowiadające im scRNA takich efektów mogą nie mieć, gdyż są to efekty specyficzne dla sekwencji. Stąd wręcz zaleca się wykorzystanie 2-3 sekwencji shRNA na dany cel i optymalnie eksperyment kontrolny typu „rescue”. Oczywiście w przypadku doświadczeń *in vivo* czy *in ovo* jest to bardzo czasochłonne. Dlatego aby wnioskować, iż mamy do czynienia z fenotypowym efektem wyciszenia lub jego brakiem, koniecznym minimum powinno być potwierdzenie w jakimś układzie eksperymentalnym, iż użyte shRNA w sposób istotny obniża ekspresję badanego genu. O ile w przypadku *RPSA* i *GSN*, najprawdopodobniej do jakiegoś wyciszenia doszło, ponieważ zaobserwowano efekty fenotypowe (choć nie jest pewne czy specyficzne) to w przypadku *ILK*, bez potwierdzenia nokdownu nie można wnioskować, iż *ILK* nie pełni funkcji w badanych procesach.



W Rozdziale 4.3 Doktorantka wykazała, wykorzystując hodowle cew nerwowych, iż laminina-1 przytwierdzona do podłoża jest kluczowa dla delaminacji i migracji komórek grzebienia nerwowego. Pewną zagadkę, stanowi fakt, iż tyczyło się to tylko lamininy przytwierdzonej do podłoża, a nie rozpuszczonej w pożywce, podczas gdy peptyd lamininy IKVAV dodany do pożywki jednak efekt wywierał. Doktorantka wytłumaczyła to jednak w *Dyskusji* opisywanymi w literaturze zmianami konformacyjnymi lamininy w zależności od formy jej podania.

W Rozdziałach 4.4 i 4.5 zbadana została lokalizacja komórkowa i pozakomórkowa LamR, ILK i GSN w komórkach grzebienia nerwowego w hodowlach cew nerwowych oraz wpływ użycia przeciwciał skierowanych przeciwko tym białkom w procesie delaminacji i migracji tych komórek. W efekcie wykonanych doświadczeń stwierdzono, iż „*LamR i ILK lokalizują się w komórkach grzebienia nerwowego oraz na ich powierzchni, jednak są obecne w odmiennych strukturach*”. Z kolei, żelsolina znajdowała się tylko wewnątrz komórek lub była wydzielana do medium hodowlanego. Z kolei eksperymenty opisane w Rozdziale 4.5, wykazały wg Doktorantki, że białko LamR jest istotne dla migracji komórek grzebienia nerwowego, jak również formowania filopodiów i ognisk adhezyjnych. Z kolei, podanie przeciwciał przeciwko ILK wpływało na rozprzestrzenianie się komórek grzebienia nerwowego oraz formowanie ognisk adhezyjnych. W końcu, wg Doktorantki żelsolina nie była ważna dla migracji i rozprzestrzeniania się komórek, ale była istotna dla formowania ognisk adhezyjnych. Na pochwałę badań przeprowadzonych w tej części zasługują (i) bardzo skrupulatne przeprowadzenie kontroli w przypadku barwień powierzchniowych, jeśli chodzi o integralność błony komórkowej oraz (ii) pomysłowa analiza obrazów mikroskopowych różnego typu. Natomiast, podobnie jak w przypadku Rozdziału 4.2, zabrakło mi podstawowych kontroli. Mam również wątpliwości, co do interpretacji uzyskanych wyników. W przypadku kontroli, zabrakło mi wykazania, iż obserwowane sygnały immunofluorescencyjne są specyficzne. Co prawda, przeprowadzono kontrolę bez I rzędowego przeciwciała, która jednak w mojej opinii nie dowodzi w pełni specyficzności. Również, fakt, iż przeciwciało wydaje się działać specyficznie w technice Western blot tego nie dowodzi, gdyż w technikach immunofluorescencyjnych i WB mamy do czynienia odpowiednio z epitopami natywnymi i zdenaturowanymi. Optymalnie byłoby, wykorzystać, posiadane shRNA i sprawdzić, czy po ich zastosowaniu sygnał znika pomimo zastosowania przeciwciała I rzędowego. Druga uwaga krytyczna odnosi, się do wyników osiągniętych z użyciem przeciwciała anty-GSN. Jeśli GSN nie występuje na powierzchni komórki, to zastosowane przeciwciało w najlepszym wypadku mogłoby hamować formę wydzielaną i jej opisywany w *Dyskusji* tzw. „reuptake”, co jednak należałoby udowodnić eksperymentalnie. W żaden sposób jednak, podanie przeciwciała anty-GSN nie mogłoby w sposób specyficzny wpływać na żelsolinę znajdującą się wewnątrz komórek, gdzie pełni swoją główną funkcję biologiczną. Zatem stwierdzenie, cytując, iż „*żelsolina nie jest ważna dla wczesnej migracji i rozprzestrzeniania się komórek*” jest nieuprawnione.

W Rozdziale 4.6 sprawdzono w jaki sposób różne białka macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak laminina (i jej peptydy), fibronektyna oraz kolagen wpływają

na wydłużanie neurytów neuronów DRG hodowanych *in vitro*. W efekcie Doktorantka udowodniła, że najlepszy wzrost był zapewniany przez obecność lamininy, czy to samodzielnie czy też wchodzącej w skład matryzeli. Z kolei, w Rozdziałach 4.7 i 4.8 wykorzystując podejście podobne do użytego w Rozdziałach 4.4 i 4.5, mgr Ewa Mrówczyńska oceniła lokalizację badanych przez siebie białek w komórkach DRG oraz wpływ podania skierowanych przeciwko nim przeciwciał na rozwój DRG (np. wydłużanie neurytów, kierunkowość tego procesu, migrację prekursorów komórek Schwanna, zdolność tworzenia filopodiów przez stożki wzrostu neuronów DRG). W efekcie przeprowadzonych badań Doktorantka stwierdziła, iż wszystkie analizowane białka były obecne w neuronach DRG. Przy czym, tylko ILK i GSN lokalizowały się na powierzchni komórki; choć w mojej ocenie wzór ekspresji GSN wskazuje raczej na jej pozakomórkową lokalizację, podczas gdy barwienie błonowe jest raczej zaniedbywalne. Nie stwierdzono natomiast powierzchniowej ekspresji LamR, co jest dość zaskakujące i ma poważne konsekwencje dla interpretacji wyników eksperymentów uzyskanych w dalszej części pracy. Badania opisane w Rozdziale 4.8 doprowadziły Doktorantkę do licznych konkluzji, w kwestii zaangażowania poszczególnych białek w badane parametry rozwoju komórek DRG, których nie będę tu szczegółowo przytaczał. W podsumowaniu mgr Ewa Mrówczyńska napisała, że *„każde z badanych białek pełni rolę w wydłużaniu neurytów, ich kierunkowości oraz migracji prekursorów komórek Schwanna. Dodatkowo, biorą one udział w reorganizacji aktyny w filopodiach stożków wzrostu”*. Podobnie jak w przypadku Rozdziałów 4.4 i 4.5, jestem pod ogromnym wrażeniem pomysłowości Doktorantki w kwestii analizy danych mikroskopowych. Jednocześnie, podobnie jak w przypadku tamtych podrozdziałów, mam zastrzeżenia, co do interpretacji wyników i/lub formułowania wniosków. Zacznę od najtrudniejszego do wyjaśnienia, przynajmniej dla mnie, wyniku. A mianowicie wpływu przeciwciała anti-LamR na jakikolwiek badany parametr. Doktorantka wykonując badania powierzchniowe stwierdziła, iż w badanych komórkach LamR nie występuje na powierzchni komórek. Jak zatem miałyby to przeciwciała działać na funkcje LamR? W przypadku braku ligandu, działanie przeciwciała poprzez endocytozę do wnętrza komórki, o którym wspomina Doktorantka w Dyskusji, wydaje się mało prawdopodobne. Podobne zastrzeżenie mam do testu z Ryć. 67, który miał udowodniać, iż przeciwciała ma specyficzny efekt, gdyż ogranicza adhezję komórek. W jaki sposób ją ogranicza, jeśli nie ma na powierzchni epitopu, na który miałyby działać? A zatem w przypadku wszystkich doświadczeń na komórkach DRG z użyciem przeciwciała anti-LamR, wnioski dotyczące funkcji tego białka nie są w moim odczuciu poparte eksperymentalnie. Jedyne, co można wnioskować, to że podanie tych przeciwciał wpływa w jakiś sposób na komórki, jednak bez dodatkowych doświadczeń twierdzenie, iż świadczy to o roli LamR jest na wyrost. Chciałbym się też odnieść do stwierdzenia, iż badane białka biorą udział w reorganizacji aktyny w filopodiach stożków wzrostu. Tego aspektu w pracy bezpośrednio nie badano, więc to stwierdzenie bardziej pasuje do dyskusji niż podsumowania wyników.

W Rozdziale 4.9 przeprowadzono kontrole mające wykazać, iż zastosowane przeciwciała w sposób specyficzny zaburzają funkcje badanych białek. Moim zdaniem ten rozdział mógłby się znaleźć, wcześniej przed pierwszym użyciem tych narzędzi. Jest to

jednak sprawa bardziej porządkowa, zależy od preferencji czytającego i oczywiście istnieją różne konwencje. Jednak w przypadku przeciwciała anti-GSN nie przedstawiono danych ilościowych. Poza tym, nie jest dla mnie jasne, w jaki sposób przeciwciała anti-GSN podawane do pożywki miałyby wpływać na stosunek F-/G-aktyna, na który ma wpływ żelsolina wewnątrzkomórkowa. Jak już wspomniałem powyżej, aby coś móc wywnioskować należałoby pokazać, iż (i) zahamowany jest „uptake” zwrotny wydzielonej żelsoliny lub (ii) że internalizowane przeciwciała, co sugeruje Doktorantka w dyskusji, rzeczywiście są uwalniane z endosomów i wiążą białka docelowe w komórce.

Podsumowując, w ocenianej pracy doktorskiej, przeprowadzono bardzo wiele doświadczeń, z których przynajmniej część dostarcza wartościowych informacji na temat mechanizmów rozwoju obwodowego układu nerwowego i udziału badanych białek w tym procesie. Jednak, w moim odczuciu, bez przeprowadzenia dalszych eksperymentów, w tym szeregu kontroli, pozwalających określić, czy i jak działały wykorzystane przez Doktorantkę narzędzia, część wyników nie może być w pełni poprawnie zinterpretowana.

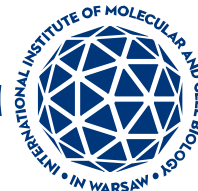
**Dyskusja.** Dyskusja przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej pani mgr Mrówczyńskiej odnosi uzyskane wyniki do istniejącego stanu wiedzy oraz skupia się na wyjaśnieniu, w jaki sposób badane białka mogą uczestniczyć w rozwoju badanych struktur. Jest to bardzo sprawnie napisana część pracy, ponownie dowodząca, iż Doktorantka posiada szeroką wiedzę w zakresie tematyki pracy. Jednak słabością tej części jest założenie, iż użyte narzędzia działały, jak przewidywano, pomimo oczywistych sprzeczności niektórych wyników (np. przytoczony powyżej efekt przeciwciał anti-LamR w komórkach DRG pomimo braku tego białka na powierzchni). Zatem w mojej ocenie, w tej części Doktorantka mogła wykazać się bardziej krytyczną oceną uzyskanych wyników i omówić oczywiste sprzeczności oraz potencjalne wady narzędzi wykorzystanych przez nią w pracy badawczej.

### **Ocena edytorskiej strony rozprawy**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest przygotowana w bardzo starannie. Od strony graficznej zdjęcia mikroskopowe są dobrej jakości, choć mikrofotografie mogłyby być nieco większe, co pozwalałoby na dokładniejszą, własną ocenę badanych zmian przez czytelnika. Na pozytywną ocenę zasługują również: bogate zilustrowanie Wstępu rycinami oraz bardzo uporządkowany, w postaci tabel, sposób przedstawienia kluczowych odczynników wykorzystywanych w pracy doktorskiej. W pracy pojawiają się pojedyncze błędy językowe lub niezbyt fortunate naukowo sformułowania, ale zwykle, o ile nie jest to problem dominujący nie wymieniam ich w recenzjach.

### **Wniosek końcowy**

Podsumowując, pomimo omówionych powyżej wątpliwości co do interpretacji niektórych wyników, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Ewy Justyny Mrówczyńskiej spełnia wymagania określone odpowiednimi przepisami. Część wyników została opublikowana w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym i przyczyniła się do poszerzenia naszej wiedzy na temat rozwoju obwodowego układu



nerwowego. W związku z tym, wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie pani mgr Ewy Justyny Mrówczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Jacek Jaworski