



Poznań, 2024-04-27

RECENZJA

Pracy doktorskiej Pani mgr inż. Justyny Grzymskiej
pt.: „**Badanie wpływu modyfikacji potranslacyjnych
na aktywność wybranych enzymów proteolitycznych**”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Justyny Grzymskiej została wykonana w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Marcina Dąga. Badania zawarte w niniejszej pracy powstały w ramach grantu TEAM (2017-4/32) Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, zatytułowanego „Wyzwania w projektowaniu selektywnych markerów do obrazowania enzymów proteolitycznych”; kierowanego przez Promotora.

Celem rozprawy sformułowanym przez Doktorantkę było zbadanie wpływu wybranych modyfikacji potranslacyjnych na aktywność katepsyn (L, B, V, S, K) oraz kaspaz (przede wszystkim kaspazy-3 oraz -7). Cele szczegółowe obejmowały: (1) Zbadanie wpływu fosforylacji oraz metylacji aminokwasów w pozycji P1 na aktywność katepsyny L, B, V, S oraz K; (2) Określenie preferencji substratowych wybranych ludzkich katepsyn w pozycjach P4-P2' za pomocą zdefiniowanej oraz kombinatorycznej biblioteki substratów fluorogenicznych; (3) Zaprojektowanie oraz syntezę tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych selektywnych względem katepsyny S; (4) Analizę kinetyczną zsyntetyzowanych tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych i wybranie sekwencji optymalnej dla katepsyny S; (5) Zaprojektowanie, syntezę i analizę biochemiczną markera chemicznego selektywnego wobec katepsyny S; (6) Zaprojektowanie, syntezę i wyznaczenie parametrów kinetycznych substratów zawierających fosforylowane reszty seryny oraz treoniny dla kaspazy-3 oraz -7.



Ocena pracy

Z formalnego punktu oceniana praca doktorska ma formę klasycznej rozprawy z podziałem na 9 głównych części. Część teoretyczna obejmuje rozdział 1, rozdział 2 omawia cele pracy, wyniki zawarte są w rozdziale 3, całość podsumowano w rozdziale 4, zawierającym też wnioski końcowe. Rozdział 5 stanowi część eksperymentalną, po czym znajduje się wykaz stosowanych skrótów, struktury aminokwasów użytych w syntezie bibliotek, spis dorobku naukowego Doktorantki. Pracę kończy spis cytowanej literatury obejmujący 266 pozycji. Praca została napisana w języku polskim i obejmuje 199 stron, na których łącznie zamieszczono 76 rysunków oraz 9 tabel.

W części literaturowej, Autorka zapoznaje Czytelnika z proteazami cysteinowymi, kładąc główny nacisk na kaspazy (w szczególności kaspazy-3 i-7) oraz katepsyny cysteinowe (spośród których szczegółowo omówiono katepsynę S). W ramach części teoretycznej, mgr inż. Justyna Grzymska umieściła też rozdział (1.3) opisujący metody określenia specyficzności substratowej proteaz, gdzie po kolei omówiła: metody chemiczne (wykorzystujące syntezę peptydów na podłożu stałym do stworzenia bibliotek substratów peptydowych min. w oparciu o strategię „mieszaj i dziel” lub z wykorzystaniem mieszaniny izokinetycznej); biologiczne (w oparciu o prezentacje fagową czy też metodę YESS), mikromacierze oraz metody PICS, TAILS, COFRADIC oraz DIPPS. Następnie omówione zostały markery chemiczne pierwszej generacji i wewnętrznie wygaszane markery chemiczne oraz wypunktowano przykłady ich zastosowania. Ostatni podrozdział tej części pracy jest poświęcony modyfikacjom potranslacyjnym, ale głównie Doktorantka skupiła się na omówieniu fosforylacji białek. Tutaj też omówiła stan wiedzy dotyczący wpływu fosforylacji w okolicy miejsc hydrolizy naturalnych aminokwasów przez kaspazę-3, -7 i -8. Pani Grzymska zwróciła też uwagę, że „fosforylacja może zatem zapewnić mechanizm regulacyjny chroniący substraty przed degradacją za pośrednictwem kaspaz”. Podała też przykłady badania profili specyficzności substratowej enzymów z wykorzystaniem nienaturalnych, w tym potranslacyjnie modyfikowanych reszt aminokwasowych.

Jak już wspomniałam, Doktorantka wyróżniła 6 szczegółowych zadań swojej pracy badawczej, a uzyskane wyniki są omówione w dwóch podrozdziałach tj. 3.1 dotyczącym badań z użyciem katepsyn oraz 3.2 dotyczącym kaspaz. Po zapoznaniu się z tymi podrozdziałami, uważam, że Doktorantka zrealizowała cele rozprawy. Swoją pracę badawczą Doktorantka zaczęła od syntezy 27 substratów o ogólnej strukturze Ac-Ala-Arg-Leu-P1-Acc (zebranych w tabeli 6), spośród których 17 stanowiły substraty zawierające aminokwasy nienaturalne np. metylowaną argininę, utlenioną metioninę, czy też fosforylowaną treoninę (patrz rys. 19). Ten etap badań pozwolił na stwierdzenie, że fosforylacja reszt serynowych oraz treoninowych całkowicie hamuje reakcję hydrolizy enzymatycznej, metylacja reszt aminowych argininy spowalnia zachodzącą reakcję, natomiast metylacja reszt kwasowych przyspiesza bądź umożliwia zajście hydrolizy w porównaniu do naturalnych reszt kwasowych w P1. W szczególności, Autorka uznała za istotny wynik wskazujący, iż katepsyna S hydrolizuje substrat z metylovanym kwasem glutaminowym w pozycji P1 z szybkością porównywalną do hydrolizy substratu z resztą L-argininy w P1. Wobec tego postanowiła wykorzystać tę informację w dalszym projektowaniu selektywnego substratu dla katepsyny S. Jednakże analizując rys. 22, można zauważyć, że spośród modyfikowanych reszt aminokwasowych w pozycji P1, L-cytrulina jest hydrolizowana przez katepsynę S nawet szybciej niż L-arginina i co najmniej 3 razy szybciej niż przy użyciu innych katepsyn. Czy zatem reszta L-cytruliny w pozycji P1 nie byłaby lepszym wyborem niż metylowany kwas glutaminowy do dalszego projektowania substratu dedykowanego katepsynie S? – proszę o komentarz.

Kontynuując, Doktorantka skupiła się na określeniu specyficzności substratowej względem kieszeni S4-S1 poszczególnych katepsyn, wykorzystując nowoczesną technologię HyCoSuL (tj. hybrydową kombinatoryczną biblioteką substratów), w której zastosowała zdefiniowane biblioteki peptydowe. Takie podejście zostało opracowane i jest od ponad dekadę stosowane w zespole Promotora - prof. dr hab. M. Dąga. I tak, mgr inż. J. Grzymska przebadła 3 podbiblioteki P2, P3, P4 zawierające po 132 substraty, odpowiednio o ogólnych wzorach: Ac-Mix-Mix-P2-Arg-ACC, Ac-Mix-P3-Mix-Arg-ACC, Ac-P4-Mix-Mix-Arg-ACC.

W dalszej kolejności Doktorantka otrzymała zdefiniowaną bibliotekę substratów fluorogenicznych (104 tetrapeptydy zebrane w tabeli 5) o ogólnym wzorze Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC i posłużyła się nią do określenia specyficzności katepas w kieszeni S1. Doktorantka stwierdziła m.in., że badana kieszeń wiążąca S1 jest silnie konserwatywna oraz specyficzna stereochemicznie, bo nie rozpoznaje D-aminokwasów. Następnie Doktorantka zsyntezowała bibliotekę substratów typu IQF (ang. *internally quenched fluorescent substrate*) dla kieszeni S1' o ogólnym wzorze ACC-βAla-Ala-Arg-Leu-Arg-P1'-Mix-Gly-Lys(Dnp) oraz dla kieszeni S2' o ogólnym wzorze ACC-βAla-Ala-Arg-Leu-Arg-Mix-P2'-Gly-Lys(Dnp). W obydwu przypadkach jako donora energii użyto fluoryzującą pochodną ACC (tj. kwasu 7-amino-4-kumarynooctowego) a jako akceptora energii użyto wygaszacza Dnp (2,4-dinitrofenolu) przyłączonego do reszty lizyny. Warto zaznaczyć, że przed przystąpieniem do syntezy tych bibliotek na podłożu stałym, Doktorantka przeprowadziła czteroetapową syntezę Fmoc-ACC-OH (tj. kwasu 7-N-(fluorenylometoksykarbonylo)aminokumaryno-4-octowego). Co ważne, struktury wszystkich produktów pośrednich, jak i produktu końcowego potwierdzono z wykorzystaniem techniki ¹H NMR oraz HRMS. W wyniku analiz kinetycznych, Doktorantka wykazała, że dla kieszeni wiążącej S1' wszystkich katepsyn widoczny jest brak aktywności w przypadku umieszczenia tam proliny lub jej pochodnych (L-Pro, L-Hyp, L-Hyp(Bzl)), zaś dla kieszeni wiążącej S2' nie można ustalić specyficzności substratowej. Na tej podstawie Doktorantka stwierdziła, iż przy projektowaniu substratów specyficznych dla katepsyny S zostaną pominięte wyniki otrzymane dla pozycji P1' oraz P2'. Zatem, opierając się o różne kombinacje wybranych aminokwasów w pozycjach P4-P1 otrzymano 89 (w pracy jest napisane błędnie 101) tetrapeptydowych substratów ze znacznikiem fluorescencyjnym ACC w pozycji P1' oraz z grupą acetylową chroniącą N-końcową grupę aminową (ich sekwencje zebrane są w tab. 7 razem z sekwencjami kontrolnymi bez grup acetylowych na N-końcu). Dalej, analiza otrzymanych profili specyficzności substratowej katepsyn wobec tej biblioteki substratów stała się podstawą do wybrania reszt aminokwasowych, które cechowała wysoka selektywność wobec katepsyny S. I tak, Doktorantka wskazała 7 reszt w pozycji P1, 5 w pozycji P2, 7 w pozycji P3 oraz 12

w pozycji P4. W rezultacie kolejnych badań Doktorantka wybrała substrat cechujący się największą selektywnością wobec katepsyny S tj. peptyd JG_103 o sekwencji (Ac-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC), który zawierał 2 modyfikacje potranslacyjne tj. w pozycji P1 (metylacja kwasu glutaminowego) i w pozycji P3 (cytrulinacja argininy). W oparciu o tę sekwencję Doktorantka zaprojektowała fluorescencyjny marker chemiczny zdolny do inhibicji katepsyny S (Cy5-PEG(4)-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-AOMK), dla którego wyznaczono drugorzędowe stałe szybkości reakcji inhibicji (k_{obs}/I) wobec katepsyny S, B, L, V oraz K. Autorka wykazała, że otrzymany marker chemiczny hamuje aktywność katepsyny S 1 700 silniej niż katepsyny B, 7 000 razy silniej niż katepsyny L oraz 30 000 razy silniej niż katepsyny V.

Drugą część swojej pracy, Doktorantka poświęciła poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie czy fosforylacja w dowolnej pozycji sąsiadującej z miejscem hydrolizy ma wpływ na aktywność kaspaz. Motywacją do podjęcia tych badań były sprzeczne informacje zawarte w pracach innych badaczy nad aktywnością katalityczną kaspaz (głównie -3, -7, -8). W pierwszej kolejności Doktorantka skupiła się nad analizą wpływu fosforylacji L-treoniny w pozycjach P2 oraz P1' dla sekwencji peptydowych pochodzących z YAP1 oraz L-seryny w pozycji P2' analogu VIME wobec kaspazy-3. W tym celu Pani Grzymska zsyntezowała sześć substratów typu IQF o sekwencjach tj. S1_YAP1: ACC- β AVDEMDT⁴²⁵GDTIK(Dnp); S2_[pT]YAP1: ACC- β AVDEMDpT⁴²⁵GDTIK(Dnp); S3_YAP1: ACC- β AQAST¹¹⁰DAGTAGK(Dnp); S4_[pT]YAP1: ACC- β AQASpT¹¹⁰DAGTAGK(Dnp); S5_VIME: ACC- β AQDSVDFS⁸⁷NHDK(Dnp); S6_[pS]VIME: ACC- β AQDSVDFpS⁸⁷NHDK(Dnp). Dodatkowo sprawdzono, czy powyższe substraty są rozpoznawne przez kaspazę -6, -7,-8. Ponadto w celu oszacowania wpływu fosforylacji na efektywność hydrolizy substratów przez kaspazę-3 oraz -7 zsyntezowano serię substratów peptydowych w oparciu o opisaną sekwencję ACC β ADEVD↓GVK(Dnp)D zawierającą motyw pochodzący z białka PARP. W sumie przebadanych zostało 8 substratów typu IQF, wśród których związki z Asp oraz Glu w pozycji P1 zastosowano jako substraty kontrolne, natomiast peptydy zawierające Ser, pSer, Thr, pThr a także analogi seryny i treoniny, czyli

Pma i Pmab wykorzystano do zbadania wpływu fosforylacji pozycji P1. Ponadto w oparciu o sekwencję dobrze znanego substratu rozpoznawanego przez kaspazę-3 oraz -7, Ac-DEVD-ACC zsyntetyzowano kilka pochodnych tetrapeptydowych, wstawiając w pozycji P1 reszty: Glu oraz Ser jako substraty kontrolne a także pSer oraz Pma. Dla wszystkich tych substratów przeprowadzono reakcje hydrolizy w obecności kaspazy -3 oraz -7 i wyznaczono parametry kinetyczne.

Do najważniejszych wyników w tej części pracy można zaliczyć: (1) wykazanie, że kaspazy-6, -7 oraz -8 nie hydrolizują żadnego z substratów z fosforylowaną L-treoniną lub L-seryną (S2_[pT]YAP1, S4_[pT]YAP1, S6_[pS]VIME) w przeciwieństwie do kaspazy-3 która nie rozpoznaje tylko S4_[pT]YAP1 (2) przeprowadzenie analizy miejsca hydrolizy substratu S6_[pS]VIME, w wyniku czego stwierdzono, że kaspaza-3 hydrolizuje substrat po karboksylowej stronie fosfo-L-seryny; (3) wykazanie, że kaspazy-3 oraz kaspazy-7 mają zdolność do hydrolizy peptydowego substratu, którego sekwencja pochodzi z białka PARP zawierającego fosforylowaną serynę w pozycji P1 (substrat (P1)_pSer o sekwencji ACC-βADEVpS↓GVK(Dnp)D), ale nie wykazują aktywności enzymatycznej wobec krótkiej sekwencji tetrapeptydowej (Ac-DEVpS-ACC); (4) przeprowadzenie analizy miejsca hydrolizy substratu P(1)_pSer, w wyniku czego stwierdzono, że obie kaspazy hydrolizują substrat po karboksylowej stronie fosfo-L-seryny.

Jeżeli chodzi o eksperymenty mające na celu potwierdzenie przewidywanego miejsca hydrolizy substratów S6_[pS]VIME oraz P(1)_pSer, to w każdym przypadku otrzymane sygnały na widmach masowych zostały odpowiednio przypisane i zinterpretowane, a miejsca hydrolizy substratów wskazane prawidłowo. Jednak mam kilka uwag odnośnie wyników dotyczących hydrolizy P(1)_pSer: (1) brakuje mi eksperymentu kontrolnego z naturalną L-seryną, analogicznego do tego przeprowadzonego dla sekwencji peptydowej pochodzącej z VIME; (2) na chromatogramach pokazujących produkty hydrolizy substratu P(1)_pSer przez kaspazę -3 lub -7 sygnał odpowiadający niezhydrolizowanemu substratowi jest w postaci podwójnego pików – z czego to wynika albo inaczej czy na pewno użyty substrat był odpowiedniej czystości?



We wnioskach, Doktorantka stwierdziła, iż nie można jednoznacznie określić, że fosforylacja reszt aminokwasowych w sekwencji peptydowej substratów kaspaz jest modyfikacją powodującą całkowite zahamowanie proteolizy. Wobec tego chciałabym poznać opinię Doktorantki na temat, czy mimo wszystko fosforylacja może zapewnić mechanizm regulacyjny chroniący substraty przed hydrolizą za pośrednictwem kaspaz?

Chciałabym podkreślić, że wysoko oceniam ładunek merytoryczny ocenianej dysertacji. Jestem pod wrażeniem nie tylko ogromnej ilości pracy włożonej przez mgr. inż. Justynę Grzymską podczas realizacji celów pracy doktorskiej, ale także różnorodności tej pracy – począwszy od syntezy substratów peptydowych, poprzez ich oczyszczanie oraz analizę szybkości reakcji hydrolizy tychże substratów peptydowych i wyznaczenie parametrów kinetycznych. Z tego powodu trudno, a właściwie niemożliwe było opisanie wszystkiego z takim samym poziomem zaangażowania. Jednakże, z punktu widzenia Recenzenta (Czytelnika) mam kilka uwag odnośnie sposobu przedstawienia wyników. Jeżeli chodzi o omówienie wyników analiz kinetycznych dla poszczególnych pozycji P4-P2' ludzkich katepsyn to uważam, że w tym rozdziale wystarczyłyby mapy cieplne profili specyficzności substratowej (rys. 24, 30, 36), a zamiast rysunków z wykresami (25-29, 31-35, 37-41) wolałabym, żeby na tych mapach były zapisane wartości hydrolizy substratów wyrażone w procentach, analogicznie jak to przedstawiono na rys. 22. Analogiczna uwaga odnosi się do map cieplnych na rys. 48, 49 i 55 oraz rysunków z wykresami 43-47, 50-54 i 56-60. Poza tym w podpisach do rysunków przedstawiających profile specyficzności substratowej katepsyn brak jest informacji, że wyniki dla substratu zawierającego w badanej kieszeni najlepiej rozpoznawany aminokwas oznaczono kolorem czerwonym.

Uważam, że podpisy pod rysunkami pokazującymi schematy syntez są często zbyt szczegółowe, np. w podpisie pod rysunkiem 63 zbędna jest informacja, iż reakcję prowadzono na mieszkadle magnetycznym. Autorka zsyntetyzowała bardzo dużą ilość substratów peptydowych, których sekwencje wraz z otrzymanymi wartościami $[M+H]^+$ z analiz masowych są zebrane w kilku tabelach (o numerach 6-9), umieszczonych w części eksperymentalnej. Jeżeli chodzi o biblioteki zdefiniowanych substratów to Autorka umieściła

informacje z jaką czystością zostały otrzymane poszczególne peptydy, ale w przypadku innych syntez Autorka pisze tylko, że sprawdzono czystość, bez konkretnych danych na ten temat - dotyczy to np. Boc-Glu(O-Me)-AOMK. Ponadto uważam, że przy omawianiu wyników Doktorantka mogłaby jeszcze w kilku miejscach odnieść się do wspomnianych tabel 6-9. Chromatogramy uzyskane z analizy HPLC pokazano tylko dla eksperymentów, w których Doktorantka chciała potwierdzić miejsce hydrolizy substratu. Notabene, proszę pamiętać, że na osi y w przypadku chromatogramów HPLC jest zazwyczaj pokazana absorbancja przy konkretnej długości fali czyli wielkość bezwymiarowa, co zapisujemy AU (ang. Absorbance Units). W podpisach rysunków 65, 66, 68 lub w części eksperymentalnej brakuje jednak informacji o długości fali detekcji. Zdaję sobie sprawę, że przy tak dużej ilości pracy eksperymentalnej nie sposób pokazać wszystkich analiz, ale uważam, że warto byłoby zamieścić chociaż chromatogram z analizy HPLC dla nowo zsyntezowanego fragmentu peptydowego Boc-Glu(O-Me)-BMK, Boc-PEG-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-AOMK czy też markera Cy5-PEG(4)-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-AOMK. Natomiast w części eksperymentalnej warto byłoby też umieścić informacje o czasach retencji poszczególnych związków, na przykład dla substratów zaprojektowanych dla katepsyn w tabeli 7, czy też dla kaspaz-3 oraz -7 w tabelach 8 i 9. Zwłaszcza, że w części eksperymentalnej są zawarte informacje, w jakim układzie rozpuszczalników i na jakiej kolumnie były przeprowadzone analizy HPLC lub LC-MS. Tabela 9, umieszczona w części eksperymentalnej jest źle podpisana, gdyż zawiera dłuższe niż tetrapeptydowe substraty fluorogeniczne typu IQF zaprojektowane dla kaspazy-3 i -7. W pracy brakuje mi choć kilku przykładowych wykresów, których Doktorantka użyła do wyznaczenia parametrów kinetycznych fluorescencyjnego markera chemicznego M_JG_103 względem badanych katepsyn (jest tylko opis na stronie 110) czy też dla wyników zawartych w tabeli 3 lub 4. Wykaz skrótów jest niepełny, brakuje tam choćby rozwinięcia skrótu IQF (ang. *internally quenched fluorescent substrate*).

W tym miejscu należy stwierdzić, że wyżej wymienione uwagi, w żaden sposób nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy. W pracy praktycznie nie spotyka się błędów

stylistycznych ani literówek, choć znalazłam kilka np. na stronie 35 mówią o długości fali jest nM zamiast nm; „potranlacyjnych” (str 56), czy też „zascetylowano” (str 105). Ponadto błędne jest określenie „donor fluorescencji” w przypadku omawiania substratów IQF; prawidłowo powinno się używać określenia donor energii, bo zgodnie z istotą działania pary FRET (ang. *Förster resonance energy transfer*) następuje fluorescencyjne przeniesienie energii z donora na akceptor.

Pod koniec rozprawy doktorskiej (tj. w rozdziale 8) zawarto też informacje na temat działalności naukowej Doktorantki. I tak, Pani Justyna Grzymska (wcześniej Czarna) jest współautorką 5 publikacji oraz brała udział w 4 konferencjach naukowych, gdzie wygłosiła referaty ustne (w tym 2 na konferencjach międzynarodowych). Warto zwrócić uwagę, że Doktorantka uzyskała wyróżnienie za najlepszy referat wygłoszony na konferencji „XII Copernican International Young Scientists Conference” w 2018 roku w Toruniu i zajęła I miejsce za prezentację ustną podczas XVII Ogólnopolskiego Seminarium dla Doktorantów i Studentów „Na pograniczu chemii i biologii” w 2019 roku, w Jastrzębiej Górze. Jak wspomniano na początku, mgr inż. J. Grzymska brała udział w realizacji grantu TEAM nr POIR.04.04.00-00-40CE/17-00, ponadto uzyskała finansowanie swoich badań na poziomie Uczelni (tj. z dotacji podmiotowej w latach 2017 i 2020).

Podsumowując, podjęta tematyka dotycząca wpływu modyfikacji potranslacyjnych na aktywność wybranych katepsyn oraz kaspaz jest jak najbardziej aktualna i niewątpliwie ma potencjał aplikacyjny. Projekt rozprawy jest przemyślany, cele jasno określone i osiągnięte przy dużym nakładzie pracy. Wnioski są poparte danymi eksperymentalnymi i w większości przypadków odniesieniami do stanu wiedzy w literaturze. Uzyskane i opisane w ramach niniejszej pracy wyniki bezsprzecznie poszerzyły wiedzę na temat preferencji kieszeni wiążących S4-S2' katepsyny S, usystematyzowały wiedzę na temat specyficzności P4-P2' dla katepsyn B, L, V, K oraz zweryfikowały informacje na temat wpływu fosforylacji substratów na aktywność enzymatyczną kaspazy-3 i-7. Ponadto mogą stanowić punkt wyjścia do podejmowania kolejnych prac badawczych nad opracowaniem selektywnych narzędzi dla badania/diagnostyki katepsyn oraz kaspaz, w szczególności katepsyny S.



Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Justyny Grzymskiej zatytułowana „Badanie wpływu modyfikacji potranslacyjnych na aktywność wybranych enzymów proteolitycznych” spełnia kryteria określone w art. 187 ust. 1-2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Justyny Grzymskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Ponadto z uwagi na szeroki zakres badań, jak i ich wartościowy naukowo oraz wysoki poziom merytoryczny, wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem,

dr hab. Anna Dembska, prof. UAM