



UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
Zakład Genetyki Klinicznej
ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin
tel./fax. 81 448 61 10; E-mail: janusz.kocki@umlub.pl
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Janusz Kocki

Lublin, dnia 17. 09. 2023 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt. „ Genetyczna i epigenetyczna regulacja funkcji komórek jądra z udziałem estrogenów”

magistra Michała DULIBANA

z Zakładu Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

W odpowiedzi na prośbę pani prof. dr hab. Marii Rapały-Kozik, Przewodniczącej *Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie*, przedstawiam recenzję rozprawy doktorskiej magistra Michała Dulibana, ubiegającego się o stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Małgorzaty Kotuli-Balak, z Zakładu Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Rozprawę doktorską stanowi monotematyczny cykl czterech publikacji opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych z listy *JCR*:

Publikacja 1: Mouse testicular transcriptome after modulation of non-canonical oestrogen receptor activity. M. Duliban, A. Gurgul, T. Sztatola, P. Pawlicki, A. Milon, Z. J. Arent, P. Grzmil, M. Kotula-Balak, B. Bilinska. *Reproduction, Fertility and Development* <https://doi.org/10.1071/RD20025>. Doktorant jest autorem korespondencyjnym. Wkład Doktoranta w pracę związany był planowaniem i przeprowadzeniem badań, opracowaniem wyników, przygotowaniem manuskryptu i korespondencją z redakcją. Autor ocenił na 50% swój wkład w wykonanie publikacji. IF=1,723; 140 punktów MEiN.

Publikacja 2: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ , but Not α or G-Protein Coupled Estrogen Receptor Drives Functioning of Postnatal Boar Testis - Next Generation Sequencing Analysis. M. Duliban, P. Pawlicki, A. Gurgul, R. Tuz, Z. Arent, M. Kotula-Balak, K. Tarasiuk. *Animals* 2021, 11, 2868. <https://doi.org/10.3390/ani11102868>. Doktorant jest autorem korespondencyjnym. Jego udział w pracy stanowi 55% i związany był ze zbieraniem materiału, walidacją metod, przeprowadzeniem i analizą badań, opracowaniem i wizualizacją danych, napisaniem i redakcją manuskryptu oraz korespondencją z redakcją. IF=2,752; 100 punktów MEiN.

Publikacja 3: Transcriptome analysis of human Leydig cell tumours reveals potential mechanisms underlying its development. M. Kotula-Balak, M. Duliban, A. Gurgul, I. Krakowska, P. Grzmił, B. Bilinska, J. K. Wolski. *Andrologia*. 2021;53:e14222. Wkład Doktoranta w pracę związany był planowaniem i przeprowadzeniem badań, opracowaniem wyników, przygotowaniem manuskryptu i korespondencją z redakcją. Autor ocenił na 65% swój wkład w wykonanie tej publikacji (z oświadczeń współautorów wynika, że wkład Doktoranta to 55%). IF=2,775; 70 punktów MEiN.

Publikacja 4: Status of estrogen receptor expression and epigenetic methylation in Leydig cells after exposure to metalloestrogen - selenium M. Duliban, P. Pawlicki, A. Kamińska, B. Yurdakok-Dikmen, K. Tekin, M. Kotula- Balak. *Reproductive Toxicology* 118 (2023) 108389. Wkład Doktoranta w pracę związany był planowaniem i przeprowadzeniem badań, opracowaniem wyników, przygotowaniem manuskryptu i korespondencją z redakcją. Doktorant jest autorem korespondencyjnym i swój wkład w wykonanie pracy na 55% (z oświadczeń współautorów wynika, że wkład Doktoranta to 65%). IF=3,421; 70 punktów MEiN.

Łączny IF ww. czterech publikacji to 10,671 (380 punktów MEiN).

Rozprawa doktorska jest napisana poprawnie w języku polskim i jest przedstawiona w formie wydruku komputerowego. Rozprawa liczy 113 stron, jest podzielona na następujące rozdziały - typowe dla tego rodzaju opracowań: *Streszczenie w języku polskim* str. 4-6, *Streszczenie w języku angielskim* str. 7-9, *Wykaz stosowanych skrótów* str. 10-12, *Cykl publikacji składających się na rozprawę doktorską* str. 13, *Wstęp* str. 14-23, *Cel i hipotezy badawcze* str. 24, *Materiały i model badawczy* str. 25-28, *Kopie oryginalnych prac badawczych* str. 29-72, *Rezultaty i dyskusja* str. 73-80, *Wnioski* str. 81-82, *Finansowanie badań* str. 83, *Oświadczenia współautorów* str. 84-93, *Bibliografia* str. 94-113.

Należy podkreślić bardzo dobrze dobrany spis skrótów zastosowanych w pracy, w tym skróty nazw genów – co bardzo ułatwia czytanie rozprawy doktorskiej.

Wysoko oceniam wybór tematu rozprawy doktorskiej. Podjęty temat rozprawy doktorskiej jest bardzo ważny klinicznie. W praktyce klinicznej często spotykamy się z zaburzeniami funkcji receptorów estrogenowych w procesach determinacji płci u człowieka w różnych etapach embriogenezy a także w chorobach nowotworowych, w tym w raku piersi. Pierwsze publikacje dotyczące udziału receptorów estrogenowych w spermatogenezie u myszy pochodzą z roku 2008. Publikacje Promotora rozprawy doktorskiej potwierdziły konieczność oddziaływania receptorów estrogenowych w utrzymaniu prawidłowej struktury komórek Leydiga.

Wstęp stanowi zbiór współczesnych informacji na temat udziału receptorów estrogenowych rozwoju gonad – i bardzo dobrze wprowadza czytelnika w temat rozprawy doktorskiej. W tym kontekście, na podkreślenie zasługują ważne klinicznie wyznaczone cele rozprawy doktorskiej, obejmujące zaplanowane badania przedstawione w rozdziale *Cel i hipotezy badawcze*.

Celem rozprawy doktorskiej było określenie wpływu nieklasycznej sygnalizacji estrogenowej na funkcje komórek jądra, z uwzględnieniem regulacji ekspresji genów i procesów epigenetycznych. Na str. 24 Doktorant przedstawił 3 założenia badawcze:

Zablokowanie lub aktywacja nieklasycznych receptorów estrogenowych oraz interakcji innych białek receptorowych prowadzi do zmian ekspresji genów w niedojrzałych i dojrzałych gonadach zwierząt.

W nowotworowych komórkach Leydiga człowieka ekspresja genów związanych z sygnalizacją estrogenową jest zaburzona.

Metaloestrogeny modulują sygnalizację estrogenową wpływając na procesy epigenetyczne w nowotworowych komórkach Leydiga.

Materiałem badawczym były myszy szczepu C57BL/6 w modelu *in vivo*, fragmenty jąder niedojrzałych 7-dniowych knurów rasy *Wielka Biała Polska* w modelu *ex vivo*, fragmenty ludzkich guzów komórek Leydiga i hodowane *in vitro* zdrowe ludzkie komórki Leydiga oraz mysia linia nowotworowych komórek Leydiga MA-10 w modelu *in vitro*. Należy podkreślić bardzo przemyślany układ zastosowanych modeli badawczych.

Badania przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Deklaracji Helsińskiej oraz po uzyskaniu stosownej zgody lokalnej Komisji Etyki przy Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie.

Poniżej przedstawiam najważniejsze osiągnięcia poszczególnych publikacji stanowiących zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Publikacja 1. Celem przeprowadzonych badań było poznanie roli dwóch receptorów: błonowego receptora estrogenowego sprzężonego z białkiem G (GPER) i receptora pokrewnego receptorom estrogenowym (ERR). Badania przeprowadzono w jądrach myszy C57BL/6. Zidentyfikowano i oceniono geny kontrolowane przez te receptory za pomocą modulacji farmakologicznej aktywności receptorów i analizę sekwencjonowania nowej generacji w systemie *HiSeq4000* (Illumina). Wykorzystano następujące modulacje farmakologiczne: G-15 – antagonistę GPER, XCT 790 - agonistę ERR i DY131 – agonistę ERRbeta/ERRgamma. Uzyskane wyniki dostarczają szczegółowych informacji na temat zmian genetycznych w transkryptomie jąder myszy w odpowiedzi na modulację nieklasycznej aktywności receptora estrogenowego. Przedstawiono hierarchiczne grupowanie i mapę cieplną profili transkryptów należących do zmienionych genów. Ekspresję wykryto za pomocą globalnej analizy wariancji (ANOVA) we wszystkich grupach badawczych u czterech myszy na grupę. Badania były finansowane w ramach grantów NCN: 2015/18/E/NZ4/00519 i 2016/23/B/NZ4/01788.

Chciałbym zwrócić uwagę na Fig. 1 i Fig. 2 w pracy, które doskonale graficznie obrazują otrzymane wyniki – metodą *heatmap* i wariancji ANOVA porównano wyniki badań otrzymane z badanych grup, w tym kontrolnej.

Do oceny ekspresji genów wykorzystano sekwencjonowanie techniką *RNA-Seq* z analizą bioinformatyczną. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że odpowiednio: 50, 86 i 171 transkryptów ulegało zróżnicowanej ekspresji w grupach poddanych ekspozycji: G-15, XCT 790 i DY131 (w porównaniu z grupą kontrolną). Przeprowadzono analizę funkcjonalną. W wyniku zablokowania lub aktywacji badanych receptorów (ERR lub GPER) w grupie „XCT 790” wykazano zwiększoną ekspresję genów zaangażowanych w procesy

immunologiczne. W grupie „DY131” geny o zwiększonej ekspresji były głównie zaangażowane w posttranslacyjną modyfikację białek. Ponadto, zablokowanie aktywności GPER zmieniło ekspresję genów w różnych innych procesach biologicznych.

Otrzymane wyniki badań są cennym źródłem do dalszych analiz ścieżek patogenetycznych u zwierząt i u człowieka. Przykładem może być jeden z genów o wysokiej ekspresji w modelu „DY131” - gen *Arpc2*. U człowieka gen *ARPC2* bierze udział w patogenezie zespołu Wiskott-Aldrich, który charakteryzuje się nieprawidłowym funkcjonowaniem układu odpornościowego, egzemą oraz zaburzoną hemostazą.

Publikacja 2. Głównym celem badania była próba identyfikacji procesów biologicznych i szlaków sygnalizacyjnych regulowanych przez receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów: PPAR α , PPAR γ i receptor estrogenowy związany z białkiem G: GPER - w niedojrzałych jądrach siedmiodniowych knurów (w badaniu *ex vivo*) - po farmakologicznej blokadzie tych receptorów. Wykazano niewielkie znaczenie funkcjonalne wyłączenia receptorów PPAR α i GPER. Znaczące wyniki uzyskano w tkankach z blokowaniem receptorem PPAR γ : zaobserwowano zmiany w procesach biologicznych takich jak metabolizm leków, tworzenia tubul, adhezji i sygnalizacji Notch. Na podstawie analizy bioinformatycznej opisano 382 transkrypty ze zmienioną ekspresją.

W pracy przedstawiono wyniki analizy sekwencjonowania nowej generacji w identyfikacji procesów biologicznych i szlaków sygnalizacyjnych regulowanych w pourodzeniowych jądrach knura – jest to prawdopodobnie pierwsze tego typu badanie na świecie. Ekspresja genów w tkankach świń jest bardzo podobna do ekspresji genów homologicznych u człowieka. Należy podkreślić dużą wartość aplikacyjną wyników przeprowadzonych badań.

Praca była finansowana w ramach działań statutowych Ministerstwa Edukacji i Nauki do Uniwersyteckiego Centrum Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu JU-UA im Rolnictwo w Krakowie (grant SUB/2020-080100-D016).

Publikacja 3. W pracy wykorzystano fragmenty tkanek uzyskanych w wyniku biopsji jądra od 3 pacjentów ze zdiagnozowaną niepłodnością i potwierdzoną azoospermią. Wynik badania histopatologicznego potwierdził łagodny guz/rozrost z komórek Leydiga. W pracy zastosowano technikę NGS - średnia wydajność mapowania była imponująco wysoka i przekroczyła 97% we wszystkich próbkach.

W trakcie obrony rozprawy doktorskiej prosiłbym Doktoranta, jeśli to możliwe, o przedstawienie rozpoznań klinicznych pacjentów, u których wykonano biopsję jąder.

Wyniki analizy bioinformatycznej wykazały istotną statystycznie różnicę w ekspresji 219 transkryptów (vs. kontrola): poziom ekspresji uległ obniżeniu dla 136 transkryptów i wzrósł dla 83 transkryptów. Zmieniona ekspresja genów w komórkach *leydigioma* dotyczyła genów szlaku sygnalizacyjnego dla apoptozy: (m.in. *TP53BP2*; *PPP1R15A*; *BCL3*; *SOD2*; *AEN*; *KRT18*; *TICAM1*; *KRT8*; *DEDD2*; *BEX3*; *PDK2*), angiogenezy (m.in.

SERPINE1; OTULIN; CCN1; EDN1; EPHB2; SHB; HMOX1) i regulacji odpowiedzi na stres (m. in. *NPM1; PPP1R15A; DNAJB1; EDN1; SOD2; BRD4; OGG1; MAPK3*).

W *leydigoma* stwierdzono obniżoną ekspresję z 135 transkryptów, z których trzy nie zostały zmapowane w zastosowanej bazie danych. Obniżona ekspresję wykazywało 132 geny odpowiedzialne m. in. reakcję na bodziec temperaturowy (m.in. *DNAJA1; DNAJB1; HSP90AA1; HSPA1; HSPH1*), szlaki apoptotyczne (*GADD45A; GADD45B; TNFAIP8; CCN1; DEDD2; FOS*) oraz odpowiedź komórkową na stres (*NPM1; DNAJA1; ADM; HSP90AA1; HSPH1; BCL3; ATF3; AEN; GADD45B*). Stwierdzono zwiększoną ekspresję 78 genów zaangażowanych w następujące procesy biologiczne związane z odpowiedzią na poziom składników odżywczych (*SPARC; APOE; OGG1; WDR59; MAPK3; PEMT; GLUL*), substancji toksycznych (*ZNF580; EPHX1; CCS; PEBP1; PEMT*) stres oksydacyjny (*ZNF580; CCS; PDK2; APOE; OGG1; MAPK3*). Niektóre z tych genów wykazujące zmienioną ekspresję: *FOS, DNAJA1* i *NPM1* mogą brać udział w sygnalizacji estrogenowej w rozwoju *leydigoma*.

W mojej opinii, wydaje się interesujące podjęcie prób reanalizy wyników NGS w celu identyfikacji niezmapowanych kilku transkryptów, co może być przyczynkiem do kolejnej publikacji w tym obszarze i przyszłych badań ludzkich nowotworów wywodzących się z komórek Leydiga.

Publikacja była finansowana w ramach grantu NCN - OPUS12 2016/23/B/NZ4/01788.

Publikacja 4. Celem badania było zbadanie wpływu selenu na sygnalizację estrogenową i status epigenetyczny komórek Leydiga. W tym celu zastosowano myszy model linii komórek Leydiga (MA-10). Komórki hodowano w medium uzupełnionym selenem w różnych stężeniach przez 24 h. Stymulacja komórek dawką selenu w stężeniu 4 μM doprowadziła do wzrostu liczebności oraz zmiany w rozmieszczeniu kropelek lipidów i wydzielaniu testosteronu oraz progesteronu w komórkach linii MA-10. W wyniku przeprowadzonych badań udowodniono, że selen wysokim stężeniu (8 μM) wpływa na ekspresję GPER w komórkach Leydiga, prawdopodobnie poprzez działanie na receptor i/lub jego wiązanie. Może to powodować pęknięcia DNA i indukować zmiany w statusie metylacji komórek Leydiga, szczególnie w metylacji *de novo*, w której pośredniczy Dnmt3b.

Na podkreślenie zasługuje doskonała dokumentacja fotograficzna przedstawiająca uzyskane wyniki badań mikroskopowych i białkowych.

Praca była finansowana w ramach grantu działalności statutowej z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na rzecz Uczelni Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UA, Akademia Rolnicza i m. Kraków (grant nr SUB/2022-080100-D016).

Reasumując, w celu oceny funkcji badanego receptora w różnych modelach w cyklu 4 publikacji zastosowano antagonistów i agonistów w dawkach wybranych na podstawie danych z piśmiennictwa oraz po przeprowadzeniu eksperymentów pilotażowych. Należy jeszcze raz podkreślić, że Doktorant zastosował cztery różne modele badawcze, bardzo dobrze dobrane do realizacji postawionych celów rozprawy doktorskiej.

W rozprawie doktorskiej zastosowano nowoczesną technikę sekwencjonowania RNA z oceną bioinformatyczną, aby ocenić funkcję badanych genów i ich interakcje na poziomie produktów białkowych. Doktorant wykorzystał również inne techniki badawcze - adekwatne

do założeń pracy: w tym analizy mikroskopowe, biochemiczne i molekularne. Wysoko oceniam dobór i zastosowanie technik badawczych.

Przedstawione przez Doktoranta wyniki badań są znaczącym wkładem w rozwój reprezentowanej dyscypliny naukowej. Jest zrozumiałe, że wykonanie badań interdyscyplinarnych przedstawionych w czterech publikacjach, wymagało pracy w zespole i udziału wielu osób. Należy podkreślić znaczący udział Doktoranta w wykonaniu procedur badawczych a także, co jest bardzo istotne, poczucie przynależności Doktoranta do *Zespołu badawczego* (np. str. 73 i 75 *Rozprawy*). Świadomość wcześniejszych wyników badań Zespołu pracującego pod kierunkiem Pani prof. Małgorzaty Kotuli-Balak i ich kontynuacji przez Doktoranta świadczy o Jego dojrzałości naukowej. Wykonanie szeroko zakrojonych badań wiązało się też z uzyskaniem finansowania, które prawdopodobnie nie było by możliwe bez dorobku Promotora i Członków całego Zespołu badawczego.

W rozdziale *Rezultaty i dyskusja* Doktorant bardzo dobrze przedstawił i udokumentował wyniki swoich badań w sposób przystępny dla czytelnika. Szczególnie podkreślam wysoką jakość wyników uzyskanych metodami sekwencjonowania. Bardzo wysoko oceniam oryginalność planu badań, oryginalność zastosowanych metod badawczych i trud pracy włożony w ich wykonanie.

Przedstawiona dyskusja wyników badań w kontekście doniesień literaturowych jest również wysokim osiągnięciem Doktoranta.

Na podstawie uzyskanych wyników badań Doktorant na str. 81-82 przedstawił 6 interesujących wniosków, opracowanych na podstawie uzyskanych wyników w cyklu publikacji – uważam, że są ważnym głosem w dyskusji na temat regulacji funkcji komórek jądra z udziałem estrogenów. Prosiłbym Doktoranta o rozwinięcie wniosku nr 6 w trakcie obrony rozprawy doktorskiej. W mojej ocenie jest on zbyt szeroki w kontekście otrzymanych wyników badań.

Stwierdzam, że wszystkie założenia badań zostały w pełni wykonane.

Doktorant przedstawił spis wykorzystanych pozycji piśmiennictwa, które są dobrze dobrane w kontekście tematyki pracy.

Przedstawione powyżej moje uwagi, jako recenzenta, nie zmniejszają w żaden sposób wartości pracy.

W podsumowaniu podkreślam, że Doktorant zrealizował badania zgodnie z wytyczonymi celami, z zastosowaniem właściwych metod badawczych, a uzyskane wyniki poprawnie zinterpretował na podstawie wykonanych analiz i danych literaturowych.

Rozprawa jest znaczącym osiągnięciem Doktoranta i spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w stosownej *Ustawie* (art. 187 *Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce; Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.*). Została przygotowywana pod opieką promotora i stanowi oryginalne rozwiązanie przez Autora problemu naukowego. Doktorant wykazał dużą, ogólną wiedzę teoretyczną w określonej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Biorąc pod uwagę nowatorski charakter badań, staranność i dbałość w przygotowaniu manuskryptu rozprawy oraz potencjalne znaczenie dla przyszłych praktycznych aplikacji klinicznych, rozprawę oceniam pozytywnie i bardzo wysoko, stawiając wniosek do *Rady*

Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie magistra Michała Dulibana do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Stwierdzam, że projekt rozprawy doktorskiej został właściwie zaplanowany a właściwy dobór metod badawczych pozwolił na bardzo dobrą realizację założeń pracy. Świadczy też o bardzo dobrym przygotowaniu Doktoranta do prowadzenia badań naukowych na bardzo wysokim poziomie.

Biorąc pod uwagę powyższe podsumowanie, zgłaszam również wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej magistra Michała Dulibana.



Janusz Kocki

Prof. dr hab. n. med. Janusz Kocki

