



Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII KOMÓRKI

kierownik Katedry i Zakładu: *prof. dr hab. Małgorzata KOTWICKA*

60-806 Poznań
ul. Rokietnicka 5D

tel.: +48 61 854 71 70
fax: +48 61 854 71 69

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Agnieszki MIŁOŃ

pt. „Receptory pokrewne receptorom estrogenowym (ERR) w funkcjonowaniu
prawidłowych i nowotworowych komórek Leydiga”

promotor: dr hab. Małgorzata Kotula-Balak, prof. UR

Podstawą opracowania niniejszej recenzji jest pismo Pana prof. dr. hab. Andrzeja Kozika, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, z dnia 26 czerwca 2020 r. z prośbą o ocenę czy rozprawa doktorska mgr Agnieszki MIŁOŃ spełnia warunki określone w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule z zakresie sztuki, wymagane do uzyskania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Uwagi wstępne

Rola estrogenów w układzie rozrodczym samców jest od lat przedmiotem intensywnych badań. Mimo, iż na obecnym etapie wiedzy wiadomo, że homeostaza androgenno-estrogenowa ma zasadnicze znaczenie dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania układu rozrodczego samców, to mechanizmy działania estrogenów na poszczególne komórki tego układu są ciągle słabo poznane. Może się to wiązać z faktem, że estrogeny działają na komórki docelowe przez różne typy receptorów, których heterogenna lokalizacja, zależna od etapu rozwoju samca nie ułatwia badań. Nawet pierwsze poznane receptory estrogenowe (ER α i ER β) należące do rodziny receptorów jądrowych, pełniące rolę czynników transkrypcyjnych występują w licznych izoformach, których powstanie jest wynikiem alternatywnego składowania. Poza klasycznym, genomowym mechanizmem działania, estrogeny mogą działać na komórki docelowe wykorzystując szybkie, błonowe szlaki transdukcji sygnału związane z błonowym receptorem GPER. Badania potwierdzające obecność ER w mitochondriach sugerują ich udział w mitochondrialnej transdukcji sygnału estrogenów. Uważa się, że estrogeny egzogenne,

poprzez obecne w mitochondriach receptory estrogenów wpływają na morfologię tych organelli. Najnowsze badania potwierdziły, że oprócz wyżej wymienionych receptorów istnieją także receptory pokrewne receptorom estrogenowym (ERR), które są zaangażowane w transdukcje sygnału estrogenów. Ponadto postuluje się, że interakcja pomiędzy receptorami ERR i ER może odgrywać istotną rolę w procesie nowotworzenia. Wskazuje się również, że występująca u samców równowaga androgenowo-estrogenowa może zostać zaburzona przez estrogenne i/lub antyandrogenne działanie ksenobiotyków. Zakłada się, że ich przyczyną może być między innymi nadmierna ekspozycja na ksenoestrogeny. Wiedza na temat wpływu ksenoestrogenów na organizm jest ciągle niewystarczająca, a wyniki dostępnych badań często prowadzą do sprzecznych wniosków. Ponadto zaburzone funkcjonowanie komórek Leydiga może skutkować istotnym zaburzeniem przebiegu spermatogenezy, a w konsekwencji znacznie wpływać na płodność samców.

W świetle powyższych danych, podjęte w recenzowanej pracy badania, których celem jest określenie roli jaka receptory pokrewne receptorom estrogenowym odgrywają w prawidłowych i nowotworowych komórkach Leydiga są uzasadnione i wpisują się w nurt najnowszych prac badawczych

Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Mgr Agnieszka Miłoś przedstawiła rozprawę doktorską w formie cyklu trzech artykułów zebranych pod wspólnym tytułem „Receptory pokrewne receptorom estrogenowym (ERR) w funkcjonowaniu prawidłowych i nowotworowych komórek Leydiga”. Przedstawiony do oceny manuskrypt oprócz kopii oryginalnych prac badawczych, wchodzących w skład cyklu tworzącego rozprawę doktorską zawierał dodatkowo następujące rozdziały: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, cel i hipotezy badawcze, materiał i metody, rezultaty i dyskusję, wnioski, finansowanie badań, oświadczenia współautorów oraz bibliografię.

Cykl trzech publikacji składających się na rozprawę doktorską to:

- [P1] – **Milon A.**, Opydo-Chanek M., Tworzydło W., Galas J., Pardyak L., Kaminska A., Ptak A, Kotula-Balak M., *Chlorinated biphenyls effect on estrogen-related receptor expression, steroid secretion, mitochondria ultrastructure but not on mitochondrial membrane potential in Leydig cells*. Cell Tissue Res. 2017 Aug;369(2):429-444.
- [P2] - Kotula-Balak M., **Milon A.**, Pawlicki P., Opydo-Chanek M., Pacwa A., Lesniak K., Sekula M., Zarzycka M., Bubka M., Tworzydło W., Bilinska B., Hejmej A., *Insights into the role of estrogen-related receptors α , β and γ in tumor Leydig cells*. Tissue Cell. 2018 Jun;52:78-91.

[P3] - **Milon A**, Knapczyk-Stwora K, Pawlicki P, Duliban M, Gorowska-Wojtowicz E, Kotula-Balak M, Bilinska B., *Effect of estrogen-related receptor silencing on miRNA protein machinery expression, global methylation, and deacetylation in bank vole (Myodes glareolus) and mouse tumor Leydig cells*. *Theriogenology*. 2019 Nov;139:178-190.

Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach, które w wykazie czasopism naukowych Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z 18 grudnia 2019 r., zostały przypisane do dyscypliny nauki biologiczne tj. do dyscypliny, w której ma być nadany stopień doktora. Ponieważ prace cyklu pochodzą z 2017, 2018 i 2019 roku, ze względu na istotne zmiany jakie w tym czasie wystąpiły w obszarze punktacji MNiSW, trudno je scharakteryzować w oparciu o powyższy wykaz. Należy jednak podkreślić, że praca P3 opublikowana w 2019 r. w *Theriogenology*, wg obowiązującego systemu punktacji posiada aż 140 pkt. co świadczy o renomie czasopisma, które wg *Journal Citation Reports* znajduje się w Q1 czasopism z obszaru nauk weterynaryjnych.

Doktorantka przy wykazie publikacji składających się na rozprawę doktorską podała przy każdej z prac wartość współczynnika oddziaływania *Impact Factor* (IF). Sumaryczny IF wszystkich publikacji ocenianego cyklu wg doktorantki wynosi 6,921. Wydaje się, że autorka podając wartości IF dla prac cyklu wynoszące odpowiednio IF=3,158, IF=1,447, IF=2,316 nie odniosła się do wartości IF z roku publikacji pracy, które wynoszą odpowiednio: 3,043, 1,553 i 2,094 (co daje łączną wartość IF=6,69), a podała pięcioletni IF wyznaczony dla wszystkich trzech czasopism w 2018 roku. Oczywiście wartość IF prac ocenianego cyklu nie wpływa w istotny sposób na wynik recenzji, ale jeśli autorka sama go podaje, warto doprecyzować jakiej wartości używa.

Doktorantka w dwóch pracach jest pierwszym autorem, a w jednej drugim autorem. W pracy P1 pierwsze autorstwo mgr Agnieszki Miłoś jest równoważne z pierwszym autorstwem Małgorzaty Opydo-Chanek. Wszystkie prace są wieloautorskie, a liczba współautorów wynosi odpowiednio: 8, 12 oraz 7. Współautorzy wszystkich prac złożyli oświadczenia, w których określili ich wkład w/w publikacje. W załączonej dokumentacji nie zawarto informacji czy artykuły cyklu były wykorzystywane przez inne osoby w postępowaniach awansowych – proszę o stosowny komentarz podczas obrony. W oświadczeniu, które przedłożyła mgr Agnieszka Miłoś stwierdza, że jej wkład w powstanie publikacji P1-P3 wynosił odpowiednio 55%, 60% i 60% i był związany z planowaniem eksperymentów, przeprowadzeniem wykonywanych badań, opracowaniem wyników i przygotowaniem prac do druku. Oświadczenia zawarte w *Author contributions*, umieszczone bezpośrednio w opublikowanych pracach ocenianego cyklu wskazują, że: 1) w pracy P1 mgr A. Miłoś wykonywała badania nie uczestnicząc w planowaniu i analizowaniu wyników, 2) w pracy P2 wykonywała badania (nie uczestnicząc w ich planowaniu i analizowaniu), a 3) w pracy P3 wykonywała badania i uczestniczyła w analizowaniu

otrzymanych wyników. Z powyższych oświadczeń umieszczonych w artykułach cyklu wynika, że mgr Miłoś odegrała kluczową rolę głównie w wykonywaniu badań. Doprecyzowania wymaga jaki był rzeczywisty udział doktorantki w planowaniu badań i analizowaniu otrzymanych wyników, co jest istotne przy ocenie rozpraw doktorskich opartych na cyklu publikacji – proszę o stosowny komentarz podczas obrony.

Ocena merytoryczna

Mgr Agnieszka Miłoś jako cel swoich badań postawiła określenie roli receptorów pokrewnych receptorom estrogenowym w prawidłowych i nowotworowych komórkach Leydiga.

Doktorantka sformułowała następujące hipotezy badawcze: 1). prawidłowe i nowotworowe komórki Leydiga wykazują różnice w morfologii i funkcji w korelacji do ekspresji receptorów ERR, 2). estrogeny i polichlorowane bifenyle (PCB) wpływają na status morfologiczno-funkcjonalny nowotworowych komórek Leydiga z udziałem receptorów ERR oraz 3). sygnalizacja estrogenowa z udziałem receptorów ERR kontroluje komórkowe, molekularne i epigenetyczne procesy w prawidłowych i nowotworowych komórkach Leydiga. W opinii recenzenta dotychczasowa wiedza i dostępna literatura upoważniały doktorantkę do postawienia powyższych hipotez.

Wykorzystanie jako materiału do badań prawidłowych komórek Leydiga izolowanych z jąder nornic rudych oraz nowotworowych, mysich komórek Leydiga linii Ma-10 uważam za właściwe. W pracy P3, w której wykorzystywano komórki pobierane z jąder nornic rudych zawarte autorzy zamieścili oświadczenie, że przestrzegano wszystkich obowiązujących międzynarodowych, krajowych i/lub instytucjonalnych wytycznych dotyczących opieki i wykorzystywania zwierząt.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Praca została zatem przygotowana w Zespole, który od wielu lat jest liderem, nie tylko w kraju, w badaniach nad rolą estrogenów w układzie rozrodczym samców.

Fakt, że artykuły ocenianego cyklu zostały opublikowane w renomowanych czasopismach, jest dowodem na właściwie dobrane metody badawcze. Należy podkreślić, że we wszystkich pracach zostały one opisane niezwykle starannie i szczegółowo. Autorzy wykorzystali zarówno najnowsze metody badawcze, jak i klasyczne metody analizy i obrazowania, stosownie do stawianych celów badawczych. Mgr Agnieszka Miłoś w swoim oświadczeniu podaje, że była osobą odpowiedzialną za prowadzenie hodowli komórkowych, przeprowadzenie transfekcji siRNA oraz przeprowadzenie analiz

metodami qRT-PCR, western blot, immunocytochemicznych i immunoenzymatycznych, co bardzo dobrze świadczy o warsztacie badawczym doktorantki.

Badania były realizowane dzięki środkom finansowym pozyskanym z Narodowego Centrum Nauki w konkursie SONATA BIS nr 2015/18/E/NZ4/00519 na projekt pt. „Sygnalizacja estrogenowa w gonadzie męskiej ssaków w rozwoju postnatalnym. Badanie molekularnych mechanizmów kontrolujących funkcjonowanie komórek Leydiga”.

Zakres badań przeprowadzonych w ocenianych artykułach, był bardzo obszerny i obejmowała odpowiednio:

- w publikacji P1 – analizę wpływu PCB na: 1) ekspresję $ERR\alpha$, $ERR\beta$ i $EER\gamma$ ocenianą na poziomie białkowym i mRNA, 2) ultrastrukturę i poziom błonowego potencjału mitochondriów, 3). sekrecję wybranych hormonów steroidowych oraz 4) stężenie jonów wapniowych w komórkach Leydiga linii komórkowej MA-10;
- w publikacji P2 - ocenę wpływu wyciszenia ekspresji genów kodujących ERR w nowotworowych komórkach Leydiga linii MA-10 na ich morfologię i potencjał proliferacyjny, morfologię i potencjał błonowych mitochondriów, steroidogenezę oraz poziom cGMP i jonów wapniowych;
- w publikacji P3 – badanie wpływu wyciszenia ekspresji genów kodujących ERR w komórkach Leydiga izolowanych z jąder nornic rudych oraz w komórkach linii MA-10 na ekspresję i lokalizację wybranych białek kontrolujących biogenezę i funkcję miRNA (Drosha, Dicer, Ago2 i Exp5), poziom globalnej metylacji genów oraz aktywność deacetylaz histonów.

Mgr Agnieszka Miłoś, wraz ze współautorami doszła do konkretnych i jasnych wniosków weryfikujących stawiane hipotezy badawcze. Autorzy wskazują między innymi, że: 1) zarówno w prawidłowych jak i nowotworowo zmienionych komórkach Leydiga receptory $ERR\gamma$ biorą udział w procesach wpływających na morfologię tych komórek, 2) receptory ERR wraz z estradiolem wpływają na aktywność proliferacyjną i migracyjną nowotworowych komórek Leydiga, 3) wyciszenie w nowotworowych komórkach Leydiga ekspresji genów kodujących ERR wpływa na zachodzącą w nich steroidogenezę, błonowy potencjał mitochondrialny oraz poziom jonów wapniowych i cGMP, 4) estradiol oraz PCB modulują ekspresję receptorów ERR w nowotworowych komórkach Leydiga oraz 5) sygnalizacja estrogenowa z udziałem receptorów ERR wpływa na epigenetyczne procesy zachodzące w prawidłowych i nowotworowych komórkach Leydiga (modulację aktywności cząsteczek wytwarzających i regulujących działanie miRNA oraz na poziom globalnej metylacji DNA).

Podsumowując zakres przeprowadzonych badań należy stwierdzić, że jest to znaczące osiągnięcie niniejszej rozprawy doktorskiej, ponieważ do tej pory w literaturze naukowej nie było tak

obszernych doniesień badających rolę jaką receptory ERR odgrywają w funkcjonowaniu prawidłowych i nowotworowo zmienionych komórkach Leydiga. O wartości ocenianych prac świadczy również fakt, że na dzień sporządzania tej recenzji, prace wchodzące w skład ocenianego cyklu, wg *Web of Science*, miały już łącznie 25 cytowań (razem z autocytowaniami).

Podsumowanie

Uważam, że mgr Agnieszka Miłoś posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a oceniana rozprawa doktorska jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego.

W mojej opinii rozprawa doktorska mgr Agnieszki MIŁOŃ pt. „Receptory pokrewne receptorom estrogenowym (ERR) w funkcjonowaniu prawidłowych i nowotworowych komórek Leydiga” oparta na cyklu trzech publikacji, spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym nauce oraz artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, wymagane do uzyskania stopnia naukowego doktora.

W związku z powyższym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr Agnieszki Miłoś do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w *dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne*

Z wyrazami szacunku,

prof. dr hab. med. Małgorzata Kotwicka