



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

dr hab. n. med. Anna A. Brożyna, prof. UMK
Katedra Biologii Człowieka
Instytut Biologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Lwowska 1
87-100 Toruń
e-mail: anna.brozyna@umk.pl

Toruń, 02.02.2024r.

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Joanny I. Nowak zatytułowanej
„The role of PDIA3 in vitamin D signaling”
wykonanej w Zakładzie Histologii na Wydziale Lekarskim Gdańskiego Uniwersytetu
Medycznego pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Michała Żmijewskiego**

1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Przedmiotem recenzji jest dysertacja Pani mgr Joanny I. Nowak, pt. „The role of PDIA3 in vitamin D signaling”. Promotorem rozprawy jest Pan prof. dr hab. Michał Żmijewski.

Podstawą formalną opracowania recenzji jest pismo z dnia 22 grudnia 2023r. (WLN.5000.2023) Pani Przewodniczącej Rady Nauk Medycznych, prof. dr. hab. M. Alicji Dębskiej-Ślizień, w sprawie powierzenia mi oceny rozprawy doktorskiej mgr Joanny I. Nowak, w oparciu o decyzję Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego podjętej 21 grudnia 2023 roku.

Recenzja ma na celu ustalenie, czy rozprawa spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 poz. 478 ze zm.). Ocenę końcową oparto na następujących kryteriach: wybór problemu badawczego i tematu rozprawy, cele i hipotezy badawcze, metodyka badań, oraz zawartość formalna i merytoryczna pracy.

2. Formalna i merytoryczna ocena pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest zbiorem tematycznie spójnych trzech artykułów, opublikowanych w Steroids w 2023, Nutrients w 2023 oraz Cells w 2023 on-line (o łącznej wartości Impact Factor: 14,66 i MNiSW: 350), co wypełnia art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity Dz.U. z 2021r. poz. 478, zgodnie z którym: „Rozprawa doktorska może mieć formę maszynopisu książki, książki wydanej lub spójnego tematycznie zbioru rozdziałów w książkach wydanych, spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopiśmie

naukowych, określonych przez ministra właściwego do spraw nauki na podstawie przepisów dotyczących finansowania nauki, jeżeli odpowiada warunkom określonym w ust. 1". Dodatkowo dysertacja została opatrzona Wstępem, opisem Celów badawczych, Dyskusją i Wnioskami odnoszącymi się do opublikowanych danych. Należy podkreślić, że we wszystkich publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej Doktorantka jest pierwszym autorem i brała udział we wszystkich etapach badań i przygotowania prac.

Badania były finansowane grantem 2017/25/B/NZ3/00431 Narodowego Centrum Nauki, w którym Pani Joanna Nowak była zatrudniona jako student-doktorant.

Podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza jest niezmiernie ważna z punktu widzenia zarówno poznawczego (określenie roli białka PDIA3 w alternatywnych szlakach aktywowanych przez witaminę D w modelu raka płaskonabłonkowego skóry) oraz potencjału terapeutycznego witaminy D i potencjału PDIA3 do bycia celem terapii przeciwnowotworowej. Jak wiadomo, aktywna forma witaminy D, 1,25(OH)2D3, poza regulacją homeostazy wapniowo-fosforanowej organizmu, wykazuje różnorodne działanie plejotropowe, w tym proróżnicujące, antyproliferacyjne, radioprotekcyjne i przeciwnowotworowe. Większość tych efektów wynika z działania poprzez klasyczny receptor witaminy D (VDR). Jednak część obserwowanych działań nie wynika z interakcji z VDR, co sugerowało działanie poprzez alternatywne receptory, w tym PDIA3, który był wskazywany jako błonowy receptor 1,25(OH)2D3, i który badała Doktorantka w ramach pracy doktorskiej. Celem pierwszej publikacji Doktorantki, zatytułowanej „PDIA3 modulates genomic response to 1,25-dihydroxy vitamin D3 in squamous cell carcinoma of the skin” (Steroids, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2023.109288>), było zbadanie wpływu 1,25(OH)2D3 na profil ekspresji genów w linii komórkowej raka płaskonabłonkowego A431, w obecności lub nieobecności PDIA3 oraz wpływ delekcji VDR i PDIA3 na proliferację, migrację i cykl komórkowy po traktowaniu 1,25(OH)2D3. Celem drugiej z wymienionych powyżej publikacji, zatytułowanej „Protein Disulfide Isomerase Family A Member 3 Knockout Abrogate Effects of Vitamin D on Cellular Respiration and Glycolysis in Squamous Cell Carcinoma” (Nutrients, 2023, <https://doi.org/10.3390/nu15214529>), było zbadanie wpływu PDIA3 na bioenergetykę i morfologię mitochondriów w komórkach raka płaskonabłonkowego oraz potencjalnego udziału PDIA3 w działaniu witaminy D w mitochondriach. Celem trzeciej z wymienionych powyżej publikacji, pt. „VDR and PDIA3 are essential for activation of calcium signaling and membrane response to 1,25(OH)2D3 in squamous cell carcinoma cells” (Cells, 2024; <https://doi.org/10.3390/cells13010011>; praca opublikowana on-line w 2023), było zbadanie udziału PDIA3 w indukowanej przez 1,25(OH)2D3 sygnalizacji wapniowej i odpowiedzi błonowej na 1,25(OH)2D3 w raku płaskonabłonkowym. Doktorantka zastosowała szeroki wachlarz metod badawczych opartych o modele komórkowe, w tym edycja genów metodą CRISPR/Cas9, testy proliferacyjne (SRB), test rany, WB, RT-PCR, techniki sekwencjonowania, metody bioinformatyczne, mikroskopię TEM, IF, analizy energetyki komórkowej Seahorse, fluorescencyjne techniki oceny wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia.

Najważniejszymi i najciekawszymi wynikami są wyniki pokazujące:

- zmiany w ekspresji około 2000 genów po delecji genu PDIA3
- identyfikację genów, których ekspresja była zależna od PDIA3 (PTGS2, MMP12, FOCAD) w komórkach A431WT, A431ΔPDIA3 w zależności od 1,25(OH)2D3
- zmiany w proliferacji, migracji i cyklu komórkowym w komórkach pozbawionych PDIA3
- zwiększoną wrażliwość na działanie 1,25(OH)2D3 w komórkach A431ΔPDIA3
- inną niż przez 1,25(OH)2D3 regulację ekspresji niektórych klasycznych genów zależnych od VDR, w tym CAMP (Cathelicidin Antimicrobial Peptide), TRPV6 (Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 6) w komórkach A431ΔPDIA3
- różną odpowiedź na 1,25(OH)2D3 komórek nowotworowych A431 i keratynocytów HaCaT,
- zmiany w morfologii i bioenergetyce mitochondriów przy delecji PDIA3
- zmiany morfologiczne mitochondriów w komórkach A431ΔPDIA3 i częściowe odwracanie efektu delecji PDIA3 przez 1,25(OH)2D3
- zmiany bioenergetyki mitochondriów i modulacja sygnalizacji STAT3 poprzez delecję PDIA3
- zróżnicowaną szybkość zużycia tlenu i szybkość zakwaszania zewnątrzkomórkowego w komórkach A431ΔPDIA3 i A431WT oraz brak wpływu 1,25(OH)2D3
- obniżenie wyjściowego poziomu wapnia i odpowiedzi komórek na 1,25(OH)2D3 przy delecji PDIA3 i VDR
- zakłócenie sygnalizacji odbłonowej indukowanej przez 1,25(OH)2D3 w komórkach A431 poprzez knockout PDIA3 lub VDR
- rolę VDR w aktywacji zależnej od wapnia/kalmoduliny kinazy białkowej II Alpha (CAMK2A) i rolę białka PDIA3 w mobilizacji wapnia w komórkach A431 indukowanej 1,25(OH)2D3.

Jak wskazano powyżej, ujęte w rozprawie doktorskiej prace badawcze zostały opatrzone dodatkowo wspólną dyskusją, która napisana jest poprawnie, w sposób logiczny przedstawia analizę wszystkich wyników. W Dyskusji Doktorantka odnosiła się do dostępnych danych literaturowych, choć w ograniczonym zakresie, podkreślając tylko najistotniejsze wyniki oraz podobieństwa i różnice z wynikami innych. Ale wynika to z formy dysertacji opartej na opublikowanych pracach. Zatem należy przyjąć, że dogłębna dyskusja byłaby w znacznej mierze powtórzeniem szczegółowych dyskusji ze wspomnianych artykułów, w których Doktorantka porównuje uzyskane wyniki z najnowszymi danymi zawartymi w międzynarodowym piśmiennictwie w sposób wyczerpujący, co wskazuje na dobrą znajomość tematyki przez Doktoranta.

Doktorantka zamieściła także podsumowanie wniosków płynących z przeprowadzonych badań oraz zaproponowała mechanizm działania odpowiedzi błonowej VDR i PDIA3 na 1,25(OH)2D3 w raku płaskonabłonkowym, co również zobrazowała graficznie.

Rozprawę doktorską Pani Joanna Nowak zakończyła podsumowaniem i wnioskami, dotyczącymi zarówno aspektów poznawczych, jak i potencjalnie użytecznych w praktyce klinicznej, z których najważniejszymi wydają się być:

- potwierdzenie, że PDIA3 może bezpośrednio lub pośrednio modulować ekspresję genów regulowanych przez 1,25(OH)2D3 w raku płaskonabłonkowym
- wykazanie roli białka PDIA3 w odpowiedzi błonowej na 1,25(OH)2D3
- wykazanie efektu PDIA3 na morfologię mitochondriów i bioenergetykę w komórkach raka płaskonabłonkowego poprzez regulację STAT3
- wykazanie, że VDR jest również niezbędny do aktywacji niegenomowej odpowiedzi na 1,25(OH)2D3
- wykazanie istotnej roli PDIA3 w fizjologii komórkowej i aktywności 1,25(OH)2D3
- wykazanie, że PDIA3 może stanowić cel terapii przeciwnowotworowej, w tym może pełnić rolę modulatora odpowiedzi na 1,25(OH)2D3 w takich terapiach.

Lektura przedłożonej do recenzji dysertacji nasunęła kilka pytań:

- jakie są perspektywy dalszych badań
- co zdecydowało o wyborze modelu badawczego (raka płaskonabłonkowego/keratynocytów)
- czy były testowane jakiegokolwiek pochodne witaminy D; jeśli tak – czy również wykazywały podobny efekt jaki obserwowano dla 1,25(OH)2D3.

3. Ocena końcowa

Przedstawione wyniki pracy doktorskiej Pani Joanny Nowak stanowią istotny wkład w scharakteryzowanie mechanizmów molekularnych plejotropowego działania kalcytriolu, w tym niegenomowego działania poprzez receptor błonowy PDIA3. Sposób przeprowadzenia badań, przygotowania pracy oraz jej prezentacja, a także interpretacja uzyskanych wyników dowodzą, że Doktorantka ma nie tylko rozległą wiedzę dotyczącą przedmiotu badań, ale także umiejętność analizy uzyskanych wyników. Szeroki zakres zastosowanych metod badawczych oraz sposób analizy uzyskanych wyników świadczą o dojrzałości naukowej Autorki i dużym stopniu samodzielności w pracy naukowej. Moje uwagi i pytania przedstawione powyżej nie podważają wysokiej wartości pracy. Uważam, że Doktorantka w pełni rozwiązała oryginalny problem badawczy, jaki przed sobą postawiła. Należy także podkreślić, że Doktorantce w ciągu trwania studiów doktoranckich udało się wykonać badania i je opublikować w formie 3 prac, co także świadczy o bardzo dobrej organizacji pracy i jasno sprecyzowanych celach, do których z sukcesem Doktorantka dąży.

4. Wniosek końcowy

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Joanny Nowak pt. „The role of PDIA3 in vitamin D signaling” spełnia wszelkie wymagania określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 poz. 478 ze zm.). W związku z powyższym przedkładam Radzie Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Joanny Nowak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, w uznaniu szerokiego zakresu badań, wartościowych i oryginalnych wyników oraz wysoką aktywność publikacyjną rekomenduję wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Kierownik
Katedra Biologii Człowieka
Brożyna
dr hab. Anna Brożyna, prof. UMK
tel. 56 611 45 99