

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny I. Nowak

pt. *The role of PDIA3 in vitamin D signaling*

Witamina D ma plejotropowy wpływ na organizmy i w dalszym ciągu odkrywane są nowe aspekty jej działania, również jeśli chodzi o mechanizmy jej aktywności w komórkach. Oprócz roli w ekspresji genów poprzez aktywację receptora VDR, działa w sposób szybszy, niegenomowy. Oczywiście badaczy interesuje, jak to się dzieje. Kandydatem do poza genomowego działania aktywnej formy witaminy D₃, czyli 1,25(OH)₂D₃ jest białko PDIA3. Ma ono aktywność izomeryzacji dwusiarczkowej, zatem bierze udział w fałdowaniu białek i głównie występuje w retikulum endoplazmatycznym (ER), ale również jest obecne w błonie komórkowej, jądrze komórkowym, mitochondriach czy cytoplazmie. Co istotne, jest uważane za receptor 1,25(OH)₂D₃ ogrywający rolę w jej szybszym, innym niż przez modulację ekspresji genów, wpływie na biologię komórek. Działanie tego białka w komórkach, szczególnie w kwestii sygnalizacji inicjowanej przez 1,25(OH)₂D₃, jest ciągle nie do końca poznane.

W tę tematykę wpisuje się praca doktorska pani mgr Joanny Nowak, której głównym celem było zbadanie roli PDIA3 w odpowiedzi na 1,25(OH)₂D₃ komórek płaskonabłonkowego raka skóry linii A341 oraz wyprowadzonych z niej linii pozbawionych genów *PDIA3* lub *VDR*. Swoje badania Doktorantka wykonała w Katedrze Histologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. dr hab. Michała Żmijewskiego, którego zespół ma doświadczenie i istotny wkład merytoryczny w badania nad działaniem witaminy D i jej metabolitów, szczególnie w aspekcie biologii i patologii komórek skóry.

Rozprawa doktorska jest przedstawiona w postaci trzech spójnych tematycznie, wieloautorskich publikacji. Są one skomentowane w *Streszczeniu* przygotowanym w języku angielskim i polskim, a także w rozdziałach napisanych w j. angielskim, tj. *Introduction, Aims, Discussion of publications included in the doctoral dissertation, Conclusions, List of references.*

Prace składające się na rozprawę doktorską mgr Nowak zostały opublikowane w 2023 roku w dobrych i bardzo dobrych czasopismach o międzynarodowym zasięgu (*Steroids, Nutrients, Cells*) o łącznym IF= 14,66 i punktach ministerialnych= 350. We wszystkich tych publikacjach mgr J. Nowak jest pierwszą autorką, a oświadczenia współautorów przekonują o Jej wiodącym wkładzie w powstanie tych prac. Opublikowanie wyników oznacza, że przeszły już ocenę ekspertów. Niemniej, z racji roli recenzenta pozwolę sobie przybliżyć najważniejsze rezultaty tych prac wraz z moimi uwagami i pytaniami.

Publikacja w *Steroids* (IF=2,76), pt. *PDIA3 modulates genomic response to 1,25-dihydroxy vitamin D3 in squamous cell carcinoma of the skin* pokazuje różne oblicza PDIA3 w biologii komórek. Brak tego białka uwrażliwia na działanie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (obniża EC_{50}) oraz hamuje zdolność migracji komórek, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ potęguje nieco ten efekt. Jest to zupełnie inny rezultat niż przy braku VDR, gdzie sama nieobecność tego receptora nie wpływa na migrację, ale hamujący efekt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ jest tracony. Wyniki te wspierają koncepcję, że PDIA3 mogłoby być obiektem terapii antynowotworowych. Dodatkowo, Doktorantka stwierdziła, że brak tego białka powoduje zmiany w ekspresji ponad 2 tys. genów. Co istotne, wyniki badań transkryptomu komórek typu wt lub pozbawionych genu *PDIA3* i traktowanych $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wskazują, że PDIA3 jest istotnym przekaźnikiem sygnału od tej witaminy i to nie tylko w szlaku poza genomowym, ale też mając wpływ na regulację ekspresji genów (nawet takich, które są typowymi markerami aktywności VDR). Produkty tych genów ogrywają rolę w gospodarce wapnia i fosforu. Co więcej, zmiany w ekspresji genów zależnych od $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ są inne (często silniejsze) ze strony prawidłowych keranocytów niż komórek nowotworu skóry, co może tłumaczyć wcześniejsze wyniki pokazujące, że komórki transformowane są mniej wrażliwe na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Mam kilka pytań do tej pracy. W legendzie do Fig. 1 A-C mowa jest o 2 punktach czasowych, a wykres przedstawia 1 krzywą. Czy odpowiada ona traktowaniu na 24 czy 72 godziny? Jak pogodzić wyniki z Fig. 1 D-G, gdzie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ daje minimalne zmiany w fazach cyklu komórkowego (szczególnie w ΔVDR i ΔPDIA3), co nie pokrywa się z ilością mRNA dla markera proliferacji lub inhibitorów Cdk? Czy porównano stopień ekspresji *PDIA3* lub poziom białka w HaCaT i A431? Może różna odpowiedź tych komórek na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wynika z różnego poziomu *PDIA3*?

Ponieważ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reguluje funkcjonowanie mitochondriów, w kolejnej pracy pt. *Protein disulfide isomerase family A member 3 knockout abrogate effects of vitamin D on*

cellular respiration and glycolysis in squamous cell carcinoma (Nutrients; IF= 5,9), badano ten aspekt w zależności od obecności lub braku PDIA3. Zauważono, że w komórkach bez PDIA3 mitochondria są ogólnie mniejsze, ale traktowanie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ częściowo odwraca ten fenotyp. Niestety ze zdjęć z mikroskopu elektronowego nie widać, co się dzieje z grzebieniami mitochondrialnymi. Stwierdzono, że $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nie zmienia istotnie potencjału mitochondrialnego w komórkach bez PDIA3. Szkoda, że nie pokazano, czy jest różnica w potencjale mitochondrialnym między komórkami wt i z delecją PDIA3. Co ciekawe, w komórkach bez PDIA3 zarówno poziomy glikolizy (mierzonej wskaźnikiem ECAR) jak i oddychania mitochondrialnego (mierzonego przez OCR) są wyższe, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ właściwie nie ma na to większego wpływu. Analiza transkryptomu mitochondrialnego wskazała, że PDIA3 odgrywa rolę głównie w metabolizmie mitochondriów, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bardziej oddziałuje na ekspresję genów i organizację tych organelli. Stwierdzono też, że w sygnalizacji od $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -PDIA3 do mitochondriów może uczestniczyć czynnik STAT3. Tu również mam kilka uwag. Fig. 6C przedstawia statut białka STAT3 w komórkach wt, ΔVDR i ΔPDIA3 przed i po traktowaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Czy Doktorantka przeliczyła stosunek p-STAT/STAT? Otrzymana wartość byłaby lepszą wskazówką odnośnie aktywacji i lokalizacji STAT3 w komórkach. Czy podpis do Fig. 5 (B i C) jest prawidłowy? Ze zdjęć z ME wyraźnie widać, że w komórkach bez PDIA3 jest więcej wakuol. Czy Doktorantka ma wiedzę na temat wpływu PDIA3 na autofagię?

W pracy pt. *VDR and PDIA3 are essential for the activation of calcium signaling and membrane response to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in squamous cell carcinoma cells* w *Cells* (IF= 6,0) badano, jak $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wpływa na gospodarkę wapniową w zależności od statusu receptorów PDIA3 lub VDR. Badaniami objęto transkryptom oraz wewnątrzkomórkowy poziom Ca^{2+} . Odkryto, że PDIA3 jest niezbędne do wzrostu poziomu Ca^{2+} w komórkach po działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, a VDR odgrywa mniejszą rolę. W komórkach bez PDIA3 mniej było białka TRVP6 będącego kanałem wapniowym. Kinetyka aktywności transkrypcyjnej genów odpowiedzi na wapń w komórkach pozbawionych PDIA3 była inna niż w przypadku komórek wt lub pozbawionych VDR, a analiza ilości i stopnia fosforylacja białek zaangażowanych w sygnalizację wapniową w odpowiedzi na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sugeruje, że oba te receptory mają udział w regulacji gospodarki wapniowej w komórkach A431. Tu mam pytanie, czy Doktorantka badała, co jest źródłem wyższego poziomu Ca^{2+} w komórkach traktowanych $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ – czy jony te pochodzą z zewnątrz czy raczej z magazynu ER?

Podsumowując, Doktorantka realizując cel badań, otrzymała szereg ciekawych wyników, do których należy zaliczyć wykazanie, że białko PDIA3 bierze udział w genomowej odpowiedzi komórek A431, regulacji metabolizmu i funkcjonowania mitochondriów oraz jest niezbędne w regulacji poziomu jonów Ca^{2+} i sygnalizacji z ich udziałem w odpowiedzi na aktywną formę witaminy D.

Wniosek końcowy

W mojej opinii oceniana praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Prezentowane w niej rezultaty są interesujące z naukowego punktu widzenia, wnoszą wiele nowych informacji o udziale PDIA3 w działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na komórki nowotworowe. Uważam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r., poz. 478 ze zm.).

Zwracam się zatem do Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z prośbą o dopuszczenie mgr Joanny Nowak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Niermen-Antosiewicz