

Bydgoszcz, dn. 29.01.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „The role of PDIA3 in vitamin D signaling”

autorstwa mgr Joanny I. Nowak

realizowanej w Katedrze i Zakładzie Histologii
Wydziału Lekarskiego
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

promotor: prof. dr hab. Michał Żmijewski

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska na stopień doktora nauk medycznych pt. „The role of PDIA3 in vitamin D signaling” autorstwa mgr Joanny I. Nowak porusza ciekawe merytorycznie zagadnienia dotyczące roli białka PDIA3 w alternatywnych szlakach aktywowanych przez witaminę D w modelu raka płaskonabłonkowego skóry. Warto podkreślić, że badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej były przeprowadzone w ramach grantu NCN OPUS 13 pt. „Alternatywne szlaki sygnalizacyjne aktywowane przez witaminę D” (nr 2017/25/B/NZ3/0043) realizowanego pod kierunkiem prof. dr hab. Michała Żmijewskiego, a w ramach którego mgr Joanna I. Nowak była zatrudniona jako Doktorantka.

Rozprawa doktorska autorstwa mgr Joanny I. Nowak ma charakter eksperymentalny i jest zbiorem 3 powiązanych tematycznie prac naukowych. Praca obejmuje 28 stron maszynopisu przygotowanego w języku angielskim. Dysertacja ma właściwy układ, jak na komentarz do opublikowanych prac naukowych. W rozprawie doktorskiej ujęto kolejno: „Listę publikacji” („List of publications”), „Skróty” („Abbreviations”), „Streszczenie” („Abstract”), „Streszczenie w języku polskim” („Abstract in Polish”), „Wstęp” („Introduction”), „Dyskusję publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej” („Discussion of publications included in the doctoral thesis”), „Wnioski” („Conclusions”), „Listę pozycji literaturowych” („List of references”), „Publikacje” („Publications”) i „Oświadczenia współautorów” („Statements of co-authors”). Załączniki w postaci wydruków publikacji oraz fotokopii oświadczeń o wkładzie merytorycznym współautorów publikacji naukowych oraz zgody współautorów na



przedłożenie prac jako część rozprawy doktorskiej dopełniają kompletności rozprawy, która łącznie liczy 86 stron. Jednakże, do zobrazowania pełniejszej sylwetki naukowej kandydatki do stopnia naukowego doktora, zabrakło mi hasłowego podsumowania dokonań Joanny I. Nowak. Wprawdzie nie jest to oficjalny wymóg stawiany rozprawom doktorskim, ale uważam, że w kontekście prac doktorskich o charakterze komentarza do zbioru opublikowanych publikacji naukowych, sylwetka doktoranta stanowi ważny element prezentujący zaangażowanie naukowe i sukcesy młodego naukowca.

Rozprawa została napisana w sposób zwięzły, zrozumiały i skupia się na najważniejszych aspektach przeprowadzonych i opublikowanych, które prowadzą do jasnych konkluzji. Język angielski rozprawy jest poprawny. Obejmuje właściwą i aktualnie używaną terminologię. Sposób edycji pracy nie budzi większych zastrzeżeń. Odnotowałem jedynie nieliczne błędy o charakterze literowym bądź stylistycznym i nie mają one wpływu na ocenę merytoryczną pracy. Dla przykładu:

- 1) drobny błąd w nazwie lokalizacji: „Melano Park” powinno zostać poprawione na „Menlo Park”.
- 2) brak spacji przed wartością numeryczną i jednostką: zamiast „for 1,25(OH)₂D₃ equaled 39,355nM.” powinno być „for 1,25(OH)₂D₃ equaled 39.355 nM.”, czy zamiast „72h” powinno być „72 h”
- 3) „impaired inhibition effectiveness” powinno być zastąpione przez „impaired the inhibitory effectiveness”
- 4) niepoprawne formatowanie wartości numerycznych: zamiast „(EC₅₀=1,346 nM and 0,019 nM respectively)” powinno być „(EC₅₀ = 1.346 nM and 0.019 nM, respectively)”
- 5) „Prolongated” powinno być zastąpione „Prolonged”
- 6) brak przecinków dla przejrzystości i niespójne formatowanie: zamiast „resulted in limited accumulation of cells in subG1 representing dying cells and the effect was more pronounced in ΔPDIA3 cells.” Powinno być „resulted in a limited accumulation of cells in subG1, representing dying cells, and the effect was more pronounced in ΔPDIA3 cells.”
- 7) „differently expressed genes (DEGs)” powinno być zastąpione przez „differentially expressed genes (DEGs)”

Prace naukowe ujęte w rozprawie doktorskiej autorstwa mgr Joanny I. Nowak zostały opublikowane w rozpoznawalnych czasopismach naukowych: *Steroids* (IF = 2.76 i 70 pkt wg MNiSW), *Nutrients* (IF = 5,9 i 140 pkt wg MNiSW) oraz *Cells* (IF = 6,0 i 140 pkt wg MNiSW), a zgodnie z załączonymi oświadczeniami można stwierdzić, że wkład Doktorantki w ich powstanie był znaczący i uzasadniony w kontekście ujęcia ich jako podstawy do nadania stopnia doktora. Ponadto, wszyscy współautorzy publikacji naukowych oświadczyli, że samodzielne i możliwe do wyodrębnienia części prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej obejmują indywidualny wkład mgr Joanny I. Nowak przy opracowaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej oraz opracowaniu i interpretacji wyników. Wiodącą rolę Doktorantki w powstaniu powyższych publikacji podkreśla fakt, że we wszystkich pracach jest ona pierwszym autorem.

Część merytoryczna rozprawy w formie komentarza do opublikowanych prac naukowych oparta jest o poprawnie dobrane i aktualne piśmiennictwo z zakresu tematyki badawczej. Rozdział „Wstęp” stanowi krótkie wprowadzenie do dyskusji wyników badań ujętych w publikacjach naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Skrótowe, ale kompletne przedstawienie istoty problemu naukowego wskazuje na ugruntowaną wiedzę Doktorantki w zakresie obranej tematyki badawczej. Rozdział ten uwzględnia kolejno: charakterystykę białka PDIA3, charakterystykę witaminy D oraz szlaki sygnalizacyjne aktywowane przez witaminę D w postaci w pełni funkcjonalnego hormonu (1,25(OH)₂D₃) z uwzględnieniem białka PDIA3. We „Wstępie” zamieszczono również rycinę prezentującą szlaki sygnalizacyjne aktywowane przez 1,25(OH)₂D₃ pochodzącą z publikacji naukowej autorstwa promotora niniejszej rozprawy doktorskiej – prof. dr hab. Michała Żmijewskiego.

Nadrzędnym celem rozprawy doktorskiej było zbadanie roli PDIA3 w genomowych i niegenomowych działaniach witaminy D w modelu raka płaskonabłonkowego skóry. Celem pierwszej publikacji cyklu (Nowak JI, Olszewska AM, Piotrowska A, Myszczyński K, Domżański P, Żmijewski MA. *PDIA3 modulates genomic response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in squamous cell carcinoma of the skin*. *Steroids*. 2023:109288) było zbadanie wpływu 1,25(OH)₂D₃ na profil ekspresji genów w komórkach raka płaskonabłonkowego skóry linii A431 w obecności lub braku PDIA3. Oceniono również wpływ delekcji VDR i PDIA3 na cechy biologiczne, takie jak proliferacja, migracja i cykl komórkowy po traktowaniu 1,25(OH)₂D₃. Druga publikacja cyklu (Nowak JI, Olszewska AM, Król O, Żmijewski MA. *Protein Disulfide*



Isomerase Family A Member 3 Knockout Abrogate Effects of Vitamin D on Cellular Respiration and Glycolysis in Squamous Cell Carcinoma. *Nutrients*. 2023;15(21):4529) skupiła się na ocenie wpływu PDIA3 na bioenergetykę mitochondrialną i morfologię raka płaskonabłonkowego skóry oraz potencjalnym zaangażowaniu PDIA3 w działanie witaminy D w obrębie mitochondriów. Natomiast trzecia publikacja (Nowak JI, Olszewska AM, Wierzbicka JM, Gebert M, Bartoszewski R, Żmijewski MA. *VDR and PDIA3 are essential for the activation of calcium signaling and membrane response to 1,25(OH)₂D₃ in squamous cell carcinoma cells*. *Cells*. 2023;13(1):11) oceniała zaangażowanie PDIA3 w sygnalizację wapniową komórek raka płaskonabłonkowego skóry indukowaną przez 1,25(OH)₂D₃ i ich odpowiedź błonową na 1,25(OH)₂D₃.

Rozprawa doktorska została bardzo dobrze zaplanowana, a dobrane przez Doktorantkę techniki badawcze pozwoliły na zrealizowanie głównego celu badawczego pracy oraz celów poszczególnych publikacji naukowych będących podstawą do przygotowania ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę zostały opisane w kontekście ich ciągłości z wcześniejszymi wynikami zespołu badawczego prof. dr hab. Michała Żmijewskiego w rozdziale „Dyskusja publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej”, co dopełnia obrazu potrzeby realizowania niniejszej pracy doktorskiej.

Pierwszą publikację cyklu stanowi praca pt. „PDIA3 modulates genomic response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in squamous cell carcinoma of the skin”, która ukazała się w listopadzie 2023 roku na łamach *Steroids* (doi: 10.1016/j.steroids.2023.109288). Warto podkreślić, że na dzień sporządzania recenzji pracę zacytowano 3-krotnie wg Web of Science w publikacjach zespołu, do którego należy mgr Joanna I. Nowak, w tym w drugiej i trzeciej publikacji cyklu stanowiącej podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej. W niniejszej pracy zastosowano podejście oparte o zsekwencjonowanie całego transkryptomu, w celu identyfikacji zmian w profilach ekspresji komórek raka płaskonabłonkowego skóry linii A431 pozbawionej PDIA3 po traktowaniu 1,25(OH)₂D₃. Zidentyfikowano zmiany w ekspresji ok. 2000 genów po delecji *PDIA3* oraz wykazano zmiany tych komórek w proliferacji, cyklu komórkowym i migracji. Komórki pozbawione *PDIA3* wykazywały zwiększoną wrażliwość na 1,25(OH)₂D₃, co skutkowało zmniejszeniem ich migracji. Traktowanie 1,25(OH)₂D₃ zmieniło również profil ekspresji genów w komórkach A431ΔPDIA3, w odniesieniu do komórek A431WT, wskazując



na istnienie genów zależnych od PDIA3. Co ciekawe, klasyczne cele receptora VDR, takie jak *CAMP* i *TRPV6*, były regulowane inaczej przez $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w komórkach A431 Δ PDIA3. Delecja *PDIA3* i traktowanie komórek $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, pozwoliły również na zidentyfikowanie genów zależnych od PDIA3, tj. *PTGS2*, *MMP12* i *FOCAD*. Dodatkowo, odpowiedź na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w komórkach nowotworowych linii A431 różniła się od unieśmiertelonych keratynocytów linii HaCaT, wykorzystanych w badaniach jako kontrola nienowotworowa. Ponadto, wyciszenie *PDIA3* i traktowanie komórek $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ przynajmniej częściowo odwróciło ekspresję genów związanych z rakiem w komórkach linii A431.

Drugą publikację cyklu stanowi praca pt. „Protein Disulfide Isomerase Family A Member 3 Knockout Abrogate Effects of Vitamin D on Cellular Respiration and Glycolysis in Squamous Cell Carcinoma”, która ukazała się w październiku 2023 roku na łamach *Nutrients* (doi: 10.3390/nu15214529). Na dzień sporządzania recenzji pracę zacytowano 1-krotnie wg Web of Science, w trzeciej publikacji cyklu stanowiącego podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej. W niniejszej pracy przedstawiono ocenę wpływu PDIA3 na morfologię i bioenergetykę mitochondriów w komórkach raka płaskonabłonkowego linii A431 traktowanych $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Zaobserwowano, że delecja *PDIA3* prowadzi do zmian morfologii mitochondriów, obejmujących zmniejszenie ich procentowej powierzchni przekroju, maksymalnej średnicy i obwodu. Natomiast traktowanie komórek A431 Δ PDIA3 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ częściowo odwróciło efekt delecji *PDIA3*, zwiększając powyższe parametry, podczas gdy w komórkach A431WT zaobserwowano tylko wzrost powierzchni przekroju mitochondriów. Co więcej, delecja *PDIA3* wpłynęła na bioenergetykę mitochondrialną (tj. fosforylację oksydacyjną i glikolizę), a także modulowała sygnalizację STAT3.

Trzecią publikację cyklu stanowi praca 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”, która ukazała się w grudniu 2023 roku na łamach *Cells* (doi: 10.3390/cells13010011). Praca nie została dotąd zacytowana wg Web of Science. W niniejszej pracy przedstawiono ocenę roli białek VDR i PDIA3 w odpowiedzi błonowej na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oraz sygnalizacji wapniowej w komórkach raka płaskonabłonkowego linii A431 z delecją genów *VDR* i *PDIA3*. Zarówno delecja *PDIA3* i *VDR* powodowały obniżenie bazowych poziomów Ca^{2+} i odpowiedzi komórek na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Jednakże efekt ten był bardziej zauważalny w przypadku delecji *PDIA3*. Ponadto delecja któregokolwiek z tych genów

zakłócała sygnalizację błonową wywołaną przez $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Wykazano również, że VDR jest niezbędny do aktywacji kinazy białkowej zależnej od wapnia/kalmoduliny kinazy białkowej II alfa (CAMK2A), podczas gdy PDIA3 jest wymagane do mobilizacji wapnia wywołanej przez $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Pracę kończy konkluzja stanowiąca, że: (1) białko PDIA3 może bezpośrednio lub pośrednio modyfikować ekspresję genów regulowanych przez $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w komórkach raka płaskonabłonkowego skóry linii A431. Ponadto, w związku z faktem, że traktowanie komórek $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ częściowo odwróciło ekspresję genów związanych z nowotworem, wydaje się, że (2) PDIA3 może być również uważane za cel terapeutyczny w leczeniu przeciwnowotworowym, a także modulatorem odpowiedzi komórek na działanie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. (3) PDIA3, prawdopodobnie poprzez regulację STAT3, wpływa na morfologię mitochondriów i bioenergetykę komórek linii A431, a także na mitochondrialną odpowiedź na działanie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. (4) PDIA3, razem z VDR, jest wymagane do regulacji sygnalizacji wapniowej wywołanej przez $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Jednak wydaje się, że (5) odpowiedź błony komórkowej na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ jest regulowana inaczej poprzez PDIA3 i VDR, odpowiednio poprzez CAMKII α i upośledzenie mobilizacji wapnia indukowanej przez $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Stąd, wyniki badań ujętych w niniejszej rozprawie doktorskiej dowodzą znaczenia PDIA3 w fizjologii komórkowej i działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ponieważ bezpośrednio lub pośrednio wpływa na kilka szlaków wewnątrzkomórkowych. Postawione wnioski w pełni odzwierciedlają nadrzędny cel badawczy pracy, jak i poszczególne cele publikacji naukowych będących podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej.

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że wyniki ujęte w rozprawie doktorskiej mgr Joanny I. Nowak są spójne i niezwykle przydatne z punktu widzenia podjętej problematyki badawczej. Doktorantka pokazała, że potrafi samodzielnie sformułować i rozwiązać problem naukowy, a także właściwie wykorzystać i połączyć różne techniki badawcze. Wskazane przeze mnie drobne błędy stanowią jedynie element kosmetyczny pracy i pokazują możliwość nieco szerszego spojrzenia na rozwiązywany problem naukowy i nie mają wpływu na jakość merytoryczną rozprawy.

W związku z powyższym, jednoznacznie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Joanny I. Nowak pt. „The role of PDIA3 in vitamin D signaling” spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2021 r., poz.



478 ze zm.). Zatem wnioskuję do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Joanny I. Nowak do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z uwagi na wysoką wartość poznawczą pracy wyrażoną w publikacjach naukowych o łącznym IF = 14,66, jakość przeprowadzonych badań, a także przejrzystość wyników prowadzących do zaproponowania mechanizmu działania VDR i PDIA3 w odpowiedzi błony komórkowej na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w raku płaskonabłonkowym skóry, wnioskuję do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Joanny I. Nowak pt. „The role of PDIA3 in vitamin D signaling”.

dr hab. n. med. i n. o zdr. Maciej Gagat, prof. UMK