

Warszawa, 29.04.2022

Prof. dr hab. Mikołaj Antoni Gralak
Katedra Nauk Fizjologicznych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
ul. Nowoursynowska 166
02-787 Warszawa

Wysoka Rada
Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
w Jastrzębcu

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt. **„Rola dysmutazy ponadtlenkowej 1 (SOD1) w regulacji metabolizmu żelaza u myszy”**, wykonanej przez mgr inż. Annę Milczarek pod kierunkiem prof. dr hab. Pawła Lipińskiego

Żelazo, oprócz tego że uczestniczy w transporcie i magazynowaniu tlenu, występuje także w miejscach aktywnych wielu enzymów takich jak np. cytochromy A, B, C, katalazy i niektóre peroksydazy. Choroby związane z niedoborem Fe należą do najbardziej rozpowszechnionych chorób związanych z żywieniem, zarówno ludzi jak i zwierząt. Oprócz anemii, niedobór żelaza może prowadzić do opóźnienia rozwoju psychomotorycznego, mielinizacji nerwu błędnego, obniżenia poziomu serotoniny w mózgu, obniżenia fal EEG w czasie snu, zaburzeń pracy serca. Stwierdzono także, że niedobór Fe obniża liczbę receptorów D₂ co zwiększa stężenie dopaminy we krwi, co skolei obniża stężenie TRH i TSH powodując spowolnienie metabolizmu w całym organizmie. Jednocześnie nadmiar żelaza będący skutkiem deregulacji metabolizmu tego mikroelementu odgrywa rolę w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, a wśród nich w rozwoju stwardnienia zanikowego bocznego (ALS). Może to mieć związek z faktem, że żelazo jonowe bierze udział w reakcjach, w których produktem ubocznym jest wysoce-reaktywny rodnik hydroksylowy (reakcja Fentona). Organizm na drodze ewolucji wytworzył kilka mechanizmów obronnych, chroniących komórki przed stresem oksydacyjnym. Pierwszym z nich jest ścisła regulacja obiegu żelaza w organizmie i komórce, a kolejne mechanizmy obronne są powiązane z enzymami

kontrolującymi poziom wolnych rodników w środowisku wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym. Należą do nich m.in. katalazy, peroksydazy i dysmutazy ponadtlenkowe. Dysmutazy ponadtlenkowe należą do grupy enzymów eliminujących $O_2^{\cdot-}$ ze środowiska komórkowego i pozakomórkowego.

W przedstawionej do oceny pracy (cykl trzech publikacji opublikowanych w recenzowanych czasopismach) Autorka podjęła próbę częściowego wyjaśnienia molekularnych podstaw homeostazy żelaza na poziomie komórkowym, roli dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1) w tym procesie i wpływu zaburzenia tej homeostazy na etiologię stwardnienia zanikowego bocznego.

W artykule przeglądowym pt. "Zaburzenie homeostazy żelaza w stwardnieniu zanikowym bocznym" (Postepy Hig Med Dosw (online), 2016; 70: 709-721, e-ISSN 1732-2693), mgr Anna Milczarek (z d. Gajowiak) scharakteryzowała obszernie aktywność biochemiczną żelaza w ośrodkowym układzie nerwowym. Szczegółowo opisała dostępną wiedzę na temat regulacji i mechanizmu transportu Fe przez barierę krew-mózg. Jednocześnie podkreśliła, że procesy te, jak i wiele innych, związanych z obrotem żelaza w ośrodkowym układem nerwowym są słabo poznane i kryją wiele tajemnic. Niewyjaśnione pozostają mechanizmy preferencyjnej akumulacji żelaza z wiekiem w niektórych strukturach mózgowia. Nieznane są mechanizmy współdziałania najważniejszych komórek ośrodkowego układu nerwowego: neuronów, oligodendrocytów, astrocytów i komórek mikrogleju w regulacji metabolizmu żelaza. W osobnym podrozdziale Autorka omówiła zaburzenia metabolizmu żelaza stwierdzone zarówno u pacjentów z ALS, jak i na modelach zwierzęcych tej patologii, oraz *in vitro*. U pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym (ALS) prawidłowością jest podwyższenie wartości biochemicznych parametrów żelaza w surowicy krwi oraz zmiany stężenia markerów białkowych, wskazujących na zaburzenia o charakterze nadmiaru żelaza. Dotyczy to podwyższonego stężenia żelaza w surowicy, zwiększonego wysycenia transferyny surowicy krwi jonami żelaza, podwyższonego stężenia ferrytyny oraz obniżonego stężenia transferyny. W badaniach na pacjentach z ALS stwierdzono, że stężenie ferrytyny w surowicy jest pozytywnie skorelowane z postępem w rozwoju ALS i śmiertelnością pacjentów. Około 10% wszystkich przypadków ALS występujących u ludzi jest uwarunkowana genetycznie, a mutacje w genie *SOD1* są odpowiedzialne za 25% tych przypadków. W badaniach na myszach obserwowano natomiast wyraźnie zwiększone stężenie DMT1 w neuronach ruchowych, co częściowo wyjaśnia molekularny mechanizm gromadzenia żelaza w tych komórkach. Ważną obserwacją poczynioną w neuronach ruchowych jest podwyższone stężenie ferrytyny mitochondrialnej (FtMt). W ALS poza

degeneracją neuronów ruchowych dochodzi do uszkodzenia i dysfunkcji mięśni szkieletowych. Wykazano że selektywna nadekspresja ludzkiego genu *SOD1* w mięśniach szkieletowych myszy doprowadza do występowania stresu oksydacyjnego w komórkach mięśniowych, zaburzenia funkcji mitochondriów i postępującej atrofii mięśni,

Następnie Pani mgr Anna Milczarek (z d. Gajowiak) sformułowała cele pracy i następujące hipotezy badawcze dotyczące homeostazy żelaza na poziomie komórkowym:

zbadanie poziomu białka regulatorowego IRP1 w wątrobie myszy w zależności od zmian aktywności dysmutazy ponadtlenkowej Cu,Zn-SOD (*SOD1*) zachodzących w trakcie rozwoju pre- i postnatalnego;

zbadanie poziomu białka IRP1 w wątrobie myszy o różnym, uwarunkowanym genetycznie poziomie ekspresji genu *Sod1*;

zbadanie aktywności enzymatycznej (akonitazowej) i *trans*-regulatorowej IRP1 w makrofagach mysich traktowanych parakwatem, związkami generującym anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) oraz określenie zmian w ekspresji regulowanych przez IRP1 transkryptów, zawierających sekwencje IRE w regionach 5' lub 3' UTR;

porównanie ekspresji wybranych genów metabolizmu żelaza w tkankach 2- i 4-miesięcznych myszy z nadekspresją zmutowanego genu *SOD1^{G93A}*, odpowiednio niewykazujących i wykazujących objawy stwardnienia zanikowego bocznego (ALS) oraz u myszy w tym samym wieku z nadekspresją normalnego ludzkiego genu *SOD1*.

W celu weryfikacji powyższych hipotez badawczych, Doktorantka przeprowadziła doświadczenia na myszach z nokautem genu *Sod1* (*Sod1^{-/-}*), myszach z jednym funkcjonalnym allelem *Sod1* (*Sod1^{+/-}*) oraz na myszach kontrolnych, „dzikich” (*Sod1^{+/+}*). Wyniki badań zostały opublikowane w „Milczarek A, Starzyński RR, Styś A, Jończy A, Staroń R, Grzelak A, et al. (2017) A drastic superoxide-dependent oxidative stress is prerequisite for the down-regulation of IRP1: Insights from studies on *SOD1*-deficient mice and macrophages treated with paraquat. PLoS ONE 12 (5): e0176800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176800>”. W publikacji nr. 2 użyto samce myszy hemizygotycznych pod względem ludzkiego transgenu *SOD1^{G93A}*, z transgenem ludzkiego normalnego genu *SOD1* oraz myszy nietransgeniczne. W części *in vitro* badano reakcję makrofagów na oksydacyjne działanie parakwatu (Gajowiak A, Stys A, Starzynski RR, Bednarz A, Lenartowicz M, Staron R, Lipinski P (2016) Mice Overexpressing Both Non-Mutated Human *SOD1* and Mutated *SOD1^{G93A}* Genes: A Competent Experimental Model for

Studying Iron Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.* 8:82. doi: 10.3389/fnmol.2015.00082)

W obu publikacjach metodyka została starannie opisana i zawiera wszystkie niezbędne informacje. Szeroki wachlarz zastosowanych metod począwszy od doboru zwierząt z nokoutem, przez oznaczenia specyficznych białek metodą Western blot, po badanie ekspresji wybranych genów metodą Real-Time qPCR, analiza histologiczna tkanek myszy oraz analiza immunofluorescencyjna rdzenia przedłużonego, nie pozostawiają wątpliwości co do celowości wykonanej pracy. Do statystycznego opracowania uzyskanych wyników Autorka zastosowała test Student'a dla prób niezależnych oraz analizę wariancji z wykorzystaniem programu Statistica 10. Moim zdaniem dobór metod statystycznych był bardzo trafny.

Wyniki pracy zostały przedstawione w dwóch publikacjach. Pierwsza z nich dotyczyła molekularnych interakcji białka regulatorowego IRP1 i aktywności dysmutazy ponadtlenkowej Cu,Zn-SOD, produkowanej u myszy o trzech różnych genotypach. W celu zbadania wpływu obecności $O_2^{\cdot-}$ na regulację białka IRP1 na poziomie komórkowym, do hodowli makrofagów dodawano parakwatu. W drugiej publikacji mgr Anna Milczarek (z d. Gajowiak) przedstawiła wyniki badań przeprowadzonych na myszach transgenicznym z nadekspresją genu ludzkiego *SOD1^{G93A}*, które są używane jako model zwierzęcy dla stwardnienia zanikowego bocznego (ALS).

W obu pracach wyniki zostały przedyskutowane i skonfrontowane z wynikami uzyskanymi wcześniej przez innych autorów. Dyskusja, w pierwszej jak i w drugiej publikacji jest dobrze napisana i dowodzi umiejętności Autorki do dobierania argumentów z piśmiennictwa. Dobrze, że doktorantka zwróciła uwagę, że niektóre wcześniejsze wyniki uzyskane przez tych samych autorów odbiegały od wyników prezentowanych w niniejszej rozprawie, co świadczy o dojrzałości i rzetelności naukowej. Z całą pewnością, przedstawiona rozprawa doktorska stanowi istotne rozszerzenie wiedzy w zakresie interakcji między stresem oksydacyjnym a metabolizmem żelaza. W szczególności dotyczy to wpływu SOD1 oraz $O_2^{\cdot-}$ na ekspresję i aktywność trans-regulatorową białka IRP1. Na podstawie uzyskanych wyników można wysunąć sugestię, że w warunkach stresu oksydacyjnego, w którym operują różne reaktywne pochodne O_2 (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$) aktywność enzymatyczna dysmutazy ponadtlenkowej SOD1 może mieć nie tylko antyoksydacyjne, ale również prooksydacyjne oddziaływanie.

Po przeczytaniu całej pracy, nasunęły mi się następujące zagadnienia/pytania do Doktorantki:

1. Skoro w przypadku stwardnienia zanikowego bocznego (ALS) obserwowano podwyższone stężenie ferrytyny mitochondrialnej (FtMt), czy wiadomo jaka jest rola

- drugiej wewnątrzkomórkowej dysmutazy nadadtlenkowej Mn-SOD (SOD2) i jaką może ona pełnić rolę regulacji białka regulatorowego IRP1?
2. W swoich badaniach Pani mgr A. Milczarek stwierdziła brak istotnej interakcji między aktywnością SOD1 i białka IRP1 u płodów myszy. Czy wiadomo kiedy i w jaki sposób dochodzi do powstania takiej zależności w życiu postnatalnym?
 3. W jakim kierunku, Pani zdaniem, powinny pójść dalsze badania nad rolą zaburzeń metabolizmu żelaza w genezie i rozwoju stwardnienia zanikowego bocznego (ALS)?

Po zapoznaniu się z publikacjami stanowiącymi podstawę pracy doktorskiej stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa „Rola dysmutazy nadadtlenkowej 1 (SOD1) w regulacji metabolizmu żelaza u myszy”, wykonanej przez mgr inż. Annę Milczarek (z d. Gajowiak) spełnia warunki zawarte w Art. 13 Ustawy z dn. 14 marca 2003 (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595, z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu wniosek o dopuszczenie mgr inż. Anny Milczarek (z d. Gajowiak) do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Milota Goralak