



RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Anny Milczarek (z domu Gajowiak) zatytułowanej
„Rola dysmutazy ponadtlenkowej 1 (SOD1) w regulacji metabolizmu żelaza u myszy”,
która została wykonana w Zespole Biologii Molekularnej Żelaza
Zakładu Biologii Molekularnej Instytutu Genetyki
i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk
pod opieką promotora prof. dr. hab. Pawła Lipińskiego

Tematyka przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej dotyczy dysmutazy ponadtlenkowej 1 (SOD1) i jej roli w regulacji metabolizmu żelaza. Badania zostały wykonane na modelu mysim, na różnych etapach rozwoju, w warunkach zmniejszonej, jak i zwiększonej aktywności SOD1. Oprócz badań *in vivo* doktorantka posiłkowała się badaniami *in vitro*, stosując mysie makrofagi (i) izolowane ze szpiku kostnego (ang. *bone marrow-derived macrophages*; BMDM) transgenicznych myszy *Irf1^{+/-}* i *Irf1^{-/-}* oraz (ii) linii RAW 264.7. Badania podjęte przez mgr inż. Milczarek są niewątpliwie nowatorskie i istotne w kontekście zrozumienia procesów zaangażowanych w metabolizm żelaza, a także etiologię stwardnienia zanikowego bocznego (ang. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*; ALS) – nieuleczalnej choroby neurodegeneracyjnej, której przyczyną upatruje się m.in. w występowaniu mutacji genu *SOD1*.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PRACY

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Milczarek zatytułowana „Rola dysmutazy ponadtlenkowej 1 (SOD1) w regulacji metabolizmu żelaza u myszy” liczy 108 stron i została przygotowana w sposób typowy dla rozpraw doktorskich powstałych w oparciu o artykuły naukowe, spełniając tym samym wymogi formalne stawiane tego typu dziełom. Rozprawę stanowią trzy publikacje: jeden artykuł przeglądowy i dwie oryginalne prace badawcze. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopiśmie z bazy Web of Science.

Pierwszą część rozprawy stanowi manuskrypt (50 stron) obejmujący: wykaz skrótów oraz prac zawartych w rozprawie, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, hipotezy badawcze, cele pracy, materiały i metody, omówienie wyników, dyskusję, wnioski i bibliografię, na którą składa się 107 pozycji, z czego 73 ukazały się w ostatnim dziesięcioleciu. Tekst tej części rozprawy wspomagany jest czterema rycinami. Warto dodać, że pod wykazem publikacji zawarto informację o finansowaniu badań ze źródeł zewnętrznych (grant Narodowego Centrum Nauki). Kolejna część rozprawy zawiera oświadczenia współautorów, określające szczegółowo ich wkład w publikacje. W ostatniej części rozprawy Pani mgr inż. Anna Milczarek prezentuje cykl trzech spójnych tematycznie publikacji naukowych opublikowanych w latach 2016-2017 w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym: (1) *PLoS One* (2017; IF2017=2,766), (2) *Frontiers in Molecular Neurosciences* (2016; IF2016=5,076), (3) *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (2016; IF2016=0,690). Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich przedłożonych do oceny prac.

Stosowne oświadczenia współautorów jednoznacznie wskazują na udział Doktorantki w przygotowanie poszczególnych prac, stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo. Treść oświadczeń potwierdza zaangażowanie Doktorantki w opracowanie koncepcji badań/przeglądu piśmiennictwa (1-3), zebranie danych literaturowych (3), wykonanie analiz laboratoryjnych (1, 2), opracowanie wyników (1, 2) i przygotowanie manuskryptów do druku (1-3).

Składające się na rozprawę doktorską praca przeglądowa oraz oryginalne prace badawcze były poddane wnikliwej analizie i ocenie przez redakcje oraz niezależnych recenzentów, a fakt opublikowania w prestiżowych czasopismach wskazuje na ich wysoką wartość naukową. Dlatego moja rola jako recenzenta tak przygotowanej rozprawy doktorskiej sprowadza się raczej do oceny manuskryptu polskojęzycznego będącego autorskim opracowaniem samej Doktorantki, ujawniającym Jej zasób wiedzy, umiejętność formułowania wniosków i posługiwania się piśmiennictwem naukowym.

MERYTORYCZNA OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Żelazo jest jednym z najważniejszych pierwiastków śladowych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania żywych organizmów. Jego niebagatelną pozycję wśród pierwiastków determinuje zaangażowanie w prawidłowy przebieg kluczowych procesów biologicznych, przede wszystkim jako aktywny biochemicznie element kofaktorów takich jak centra żelazowo-siarczkowe oraz hem, decydujących o aktywności i funkcji wielu białek. Istotą wewnątrzkomórkowej homeostazy żelaza jest, z jednej strony, dostarczenie odpowiedniej ilości żelaza aby zachować ciągłości procesów niezbędnych do przetrwania komórki, a z drugiej ograniczenie toksyczności jonów Fe(II), co wiąże się głównie z ich udziałem w reakcji Fentona. Ważną ewolucyjnie zachowaną strategią jest również obecność enzymów neutralizujących poszczególne reaktywne formy tlenu biorące udział w reakcji Fentona. Istotnym elementem systemów antyoksydacyjnych ssaków jest cytoplazmatyczna dysmutaza ponadtlenkowa - SOD1, będąca przedmiotem badań opisanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej. W większości komórek ssaków homeostaza żelaza ustala się dzięki kilku procesom do których zaliczyć możemy transport żelaza do komórki i organelli komórkowych, jego wewnątrzkomórkowe magazynowanie lub pobieranie na potrzeby syntezy białek oraz usuwanie do środowiska pozakomórkowego. W procesach tych uczestniczą liczne białka, spośród których na uwagę zasługują ferrytyna (Ft), ferroportyna (Fpn), ceruloplazmina (Cp), transferrytyna (Tf) i jej receptor (TfR1). Na straży wewnątrzkomórkowej homeostazy żelaza stoją również mechanizmy potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, zachodzące z udziałem białek regulujących – IRP (ang. *Iron Regulatory Proteins*). Zaburzenie homeostazy żelaza w komórce jest niebezpieczne dla zdrowia człowieka, a nadmiar lub niedobór żelaza w konsekwencji doprowadzić może do rozwoju poważnych schorzeń objawiających się dysfunkcją wielu narządów, a w skrajnych przypadkach śmiercią. Do najbardziej znanych schorzeń spowodowanych zaburzeniem homeostazy żelaza należą hemochromatoza i niedokrwistość. Od wielu lat prowadzone są również badania nad rolą żelaza w etiologii chorób neurodegeneracyjnych. Aczkolwiek, wciąż brak jest badań podejmujących się kompleksowej analizie regulacji metabolizmu żelaza w ośrodkowym układzie nerwowym. Do chorób neurodegeneracyjnych przebiegających z zaburzeniem metabolizmu żelaza należy ALS. Jest to choroba, w której oprócz degeneracji neuronów ruchowych obserwujemy uszkodzenie i dysfunkcję mięśni szkieletowych. W przebiegu tej choroby dochodzi do stopniowego osłabienia, atrofii i przykurczu mięśni, pogarszania się sprawności ruchowej, paraliżu i ostatecznie śmierci na skutek zatrzymania pracy mięśni oddechowych. Wśród przypadków ALS uwarunkowanych genetycznie około 20% stanowią przypadki spowodowane mutacjami w genie *SOD1*. Niestety nadal nie wiele wiemy na temat regulacji ekspresji genów metabolizmu żelaza w ALS. Zatem podjęcie przez Doktorantkę badań zmierzających do wyjaśnienia roli *SOD1* w regulacji metabolizmu żelaza jest uzasadnione potrzebą poznania podłoża oraz rozwoju zaburzeń towarzyszących patogenezie genetycznych chorób neurodegeneracyjnych,

przebiegających z zaburzeniem homeostazy żelaza. Doktorantka podczas realizacji celów szczegółowych pracy przeprowadziła szereg dobrze zaplanowanych doświadczeń *in vivo* i *in vitro*, stosując szeroki wachlarz technik biochemicznych, molekularnych, mikroskopowych. Realizując poszczególne cele testowała dwie hipotezy badawcze, że (1) zarówno brak, jak i zwiększenie aktywności SOD1, a także stres oksydacyjny, w którym dominującą reaktywną pochodną tlenu cząsteczkowego (O_2) jest anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$), wpływa na zmiany w komórkowym i tkankowym metabolizmie żelaza; (2) w tkankach myszy transgenicznych z nadekspresją zmutowanego genu *SOD1^{G93A}*, które są jednym z modeli stwardnienia zanikowego bocznego, zachodzą zmiany metabolizmu żelaza zależne i niezależne od zwiększonej aktywności SOD1.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Milczarek poprzedzona jest szczegółowym *Wstępem*, w którym Doktorantka przedstawia zagadnienia dotyczące biologicznego znaczenia oraz metabolizmu komórkowego żelaza, a także opisuje przedmiot badań – dysmutazę ponadtlenkową - SOD1 oraz chorobę neurodegeneracyjną - ALS. Doktorantka sprawnie wprowadza nas w zakres tematyczny rozprawy, poruszając w wyczerpujący sposób praktycznie wszystkie aspekty swojej pracy badawczej.

W części *Materiały i metody*, odnosząc się do poszczególnych prac eksperymentalnych stanowiących rozprawę, Doktorantka opisuje wszystkie etapy pracy eksperymentalnej, począwszy od opisanie modeli badawczych - szczepów myszy oraz komórek użytych w badaniach *in vivo* oraz *in vitro*, przez metody biochemiczne, molekularne i mikroskopowe, kończąc na metodach analizy statystycznej. Więcej uwagi poświęca opisowi analizy fluorescencyjnej preparatów rdzenia kręgowego myszy *SOD1^{G93A}* oraz typu dzikiego, której wyniki uzyskano już po opublikowaniu prac.

Rozdział *Wyniki* stanowi zwięzły, uporządkowany opis uzyskanych wyników, zaprezentowanych w przejrzysty sposób w odniesieniu do dwóch opublikowanych prac eksperymentalnych. W pierwszej z nich mgr inż. Anny Milczarek opisuje wyniki ekspresji IRP1 w wątrobie na poziomie białka w zależności od zmian aktywności SOD1, zachodzących w życiu płodowym oraz u dorosłych myszy. Wykazuje, że poziom białka IRP1 nie jest skorelowany ze zmianami aktywności SOD1. U myszy dorosłych, jedynie całkowity brak aktywności enzymatycznej SOD1 (szczep myszy *Sod1^{-/-}*) wywołuje obniżenie ekspresji IRP1. Natomiast, poziom IRP1 w wątrobie płodów *Sod1^{+/+}* i *Sod1^{-/-}* w wieku embrionalnym E14,5 i E18,5 jest bardzo zbliżony, a różnica pojawia się w pierwszym dniu życia postnatalnego (PND) i utrzymuje się przynajmniej do PND70. Doktorantka przeanalizowała również ekspresję i aktywność akonitazową oraz trans-regulatorową IRP1 w warunkach zwiększonego stężenia $O_2^{\bullet-}$ stosując w układzie eksperymentalnym linię RAW 264.7 o konstytutywnej aktywności SOD1 i parakwat (PQ), związek chemiczny ulegający redukcji do rodnikojonu, będącego prekursorem rodników nadtlenkowych. Kolejne badania zaprezentowane w pierwszej pracy dotyczyły określenia, czy obniżenie aktywności trans-regulatorowej IRP1 wpływa na ekspresję transkryptów zawierających sekwencje IRE (ang. *Iron Response Element*) w regionach 5' lub 3' UTR, odpowiednio podjednostki lekkiej Ft (L-Ft) i TfR1. W badaniach tych zastosowane zostały BMDM uzyskane od myszy *Irp1^{+/+}* i *Irp1^{-/-}*, które traktowano PQ. Okazało się, że PQ powoduje wzmocnienie komórkowej odpowiedzi antyoksydacyjnej, objawiającej się podwyższoną ekspresją L-Ft, uzyskaną dzięki jednoczesnej (i) indukcji ekspresji oraz (ii) odblokowaniu translacji genu podczas niedoboru IRP1. W drugiej publikacji mgr inż. Milczarek skupia się na prześledzeniu ekspresji genów związanych z metabolizmem żelaza stosując szczep myszy (i) z nadekspresją zmutowanego ludzkiego genu *SOD1^{G93A}* oraz (ii) z nadekspresją niezmutowanego genu *SOD1* (linia G1H), a także (iii) nietransgeniczne myszy kontrolne typu dzikiego. Doktorantka, zanim przystąpiła do głównych analiz, wykonała bardzo ważną charakterystykę modeli badawczych w kontekście zmian patologicznych charakterystycznych dla ALS. Występowanie depozytów żelaza stwierdziła jedynie w obrębie tkanki mięśnia brzuchatego łydki myszy *SOD1^{G93A}*. Natomiast podwyższony poziom SOD1 wykazała we wszystkich badanych tkankach i narządach zwierząt transgenicznych, m.in. w mięśniach szkieletowych, rdzeniu przedłużonym i rdzeniu kręgowym. Podobnej zależności nie obserwowano dla IRP1, L-Ft, Fpn, Cp oraz TfR1. Natomiast ekspresja podjednostki ciężkiej Ft (H-Ft) we wszystkich badanych tkankach była podwyższona u dorosłych myszy *SOD1* i *SOD1^{G93A}* w porównaniu do szczepu dzikiego. Tylko jeden z badanych genów *Hmox1*, kodujący oksygenazę hemową (HO1), wykazał charakterystyczną ekspresję

w mięśniach szkieletowych oraz w rdzeniu kręgowym myszy *SOD1^{G93A}*, wykazujących symptomy ALS. W badaniach wykonanych już po opublikowaniu prac, Doktorantka stwierdza zwiększoną ekspresję HO1 wyłącznie w komórkach mikrogleju rdzenia kręgowego myszy *SOD1^{G93A}*.

W zwięzłej dobrze przygotowanej *Dyskusji* mgr inż. Milczarek konfrontuje rezultaty prac eksperymentalnych z opublikowanymi już wynikami badań, umiejętnie podejmując próbę ich interpretacji. Uzyskane wyniki są logicznie powiązane z cytowanym piśmiennictwem dotyczącym tematyki rozprawy doktorskiej, doprowadzając do wysunięcia pięciu wniosków końcowych. Doktorantka umieszcza również cenne i przejrzyste graficzne podsumowanie uzyskanych wyników w postaci ryciny prezentującej koncepcję zaangażowania SOD1 i anionorodnika ponadtlenkowego w regulację toksyczności żelaza w komórce.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wyciąga dobrze sformułowane wnioski. Uznała bowiem, że jedynie brak aktywności SOD1 i silny, zależny od O_2^{\bullet} stres oksydacyjny powodują obniżenie ekspresji IRP1 oraz aktywności akonitazowej i trans-regulatorowej tego białka, co wydaje się mieć znaczenie w metabolizmie żelaza. Co więcej, stwierdziła, że zależność pomiędzy niską aktywnością SOD1 i obniżonym poziomem IRP1 w wątrobie nie występuje w okresie płodowym myszy, co powiązała ze zmniejszoną ekspozycją na O_2 . Dalsze obserwacje doprowadziły mgr inż. Milczarek do stwierdzenia, iż podwyższona aktywność SOD1 u myszy transgenicznnych z nadekspresją ludzkiego genu *SOD1* wpływa na wzrost ekspresji podjednostek Ft i może być element odpowiedzi antyoksydacyjnej na zwiększanie stężenia H_2O_2 . W świetle światowych badań dotyczących roli żelaza w etiologii chorób neurodegeneracyjnych, bardzo ważny jest wniosek o zastosowaniu równoległych badań nad etiologią ALS z użyciem różnych modeli badawczych, w tym szczepu myszy typu dzikiego. Najciekawsze wyniki zamieszczone w pracy opublikowanej w *Frontiers in Molecular Neurosciences* i dodatkowo zweryfikowane analizami immunofluorescencyjnymi HO1 w komórkach mikrogleju rdzenia kręgowego myszy *SOD1^{G93A}* zawarto w ostatnim wniosku, który wskazuje na występowanie reakcji zapalnej w przebiegu ALS.

Z uznaniem stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska, której podstawą są publikacje naukowe została opracowana bardzo dobrze. Nie ma w niej zbędnych powtórzeń, które zostały szczegółowo przedstawione w publikacjach, natomiast zarówno bardzo dobrze napisany *Wstęp*, jak i zwięzłe polskojęzyczne omówienie najważniejszych wyników prac eksperymentalnych oraz wnioski nadają pracy wspólny charakter i pokazują ważny cel pracy jakim było zbadanie roli dysmutazy SOD1 w regulacji metabolizmu żelaza u myszy, z uwzględnieniem kontekstu etiologii chorób neurodegeneracyjnych przebiegających z zaburzeniem homeostazy żelaza.

PYTANIA I UWAGI KRYTYCZNE

Jednym z elementów recenzji jest zwrócenie uwagi na braki, błędy czy nieścisłości. Przyznaję, że rozprawę mgr inż. Anny Milczarek cechuje duża staranność, choć nie ustrzegła się ona przed kilkoma niedociągnięciami. Poniżej zamieszczam w punktach kilka pytań i uwag krytycznych:

1. Wyniki zaprezentowane w pierwszej pracy eksperymentalnej nie wskazują jasno na płeć zwierząt użytych w doświadczeniach. Natomiast w drugiej pracy badania wykonywano tylko na samcach. Czy podczas planowania badań rozważano przeprowadzenie ich na osobnikach obu płci? Czy ze względu na możliwe powiązanie pewnych szlaków zapewniających prawidłową równowagę hormonalną i metabolizm żelaza można by spodziewać się innych wyników u dojrzałych płciowo samic i samców?

2. Czy na potrzeby wykonania badań z zastosowaniem myszy transgenicznnych uzyskano odpowiednią zgodę Ministra Środowiska?

3. Czym kierowano się przy wyborze genów referencyjnych do analiz real-time PCR? Jaka była stabilność tych genów w analizowanych układach eksperymentalnych? W jaki sposób przeprowadzano normalizację wyników?

4. W *Dyskusji* Doktorantka sugeruje, że regulacją nadrzędną jest zwiększenie w obecności H_2O_2 zdolności wiązania się IRP1 z sekwencjami IRE w transkryptach H- i L-Ft. Jakie doświadczenia należałoby przeprowadzić aby potwierdzi słuszność tego stwierdzenia?

5. Niestety w układzie rozprawy doktorskiej zabrakło rozdziału, który przedstawiłby perspektywę dalszych badań. Czy na podstawie uzyskanych wyników, oprócz tych wskazanych na przykład w *Dyskusji*, a dotyczących roli HO1 w patologii ALS, można by zasugerować jeszcze inne, nowe kierunki badań?

6. W rozprawie zauważyć można kilka błędów językowych, interpunkcyjnych i redakcyjnych, a także brak konsekwencji w zapisie (np. min./minut, temp./temperaturze) lub nieprawidłowe powiązanie opisów z pracami źródłowymi wchodzącymi w skład rozprawy.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu należy stwierdzić, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki wzbogacają naszą dotychczasową wiedzę o nowe informacje na temat interakcji jakie mogą zachodzić między stresem oksydacyjnym a metabolizmem żelaza. Wskazują też na ważne aspekty planowania badań nad metabolizmem żelaza na modelu mysim ALS. Pani mgr inż. Anna Milczarek wykazała się doskonałym opanowaniem nowoczesnych technik badawczych z zakresu biochemii, biologii molekularnej i mikroskopii. Wszystkie wskazane cele szczegółowe pracy zostały osiągnięte. Wnioski końcowe znajdują poparcie w przedstawionych wynikach. Z całą pewnością można uznać przeprowadzone analizy za nowatorskie i dobrze udokumentowane. Duża wartość rozprawy wynika z kompleksowego podejścia do rozpatrywanego problemu oraz zastosowania różnych modeli badawczych i odpowiednio dobranych, nowoczesnych metod.

WNIOSEK KOŃCOWY

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Anny Milczarek spełnia wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z obowiązującymi przepisami i mam zaszczyt wnieść do Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Milczarek (z domu Gajowiak) do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo. Jednocześnie, z uwagi na nowatorski charakter oraz wysoką wartość naukową rozprawy, której wyniki zostały opublikowane w czasopismach indeksowanych w Web of Science wnioskuję o jej wyróżnienie.

Olsztyn, 27 kwietnia 2022 r.