



INSTYTUT GENETYKI
I BIOTECHNOLOGII ZWIERZĄT
Polskiej Akademii Nauk

INSTITUTE OF GENETICS
AND ANIMAL BIOTECHNOLOGY
of the Polish Academy of Sciences



Polska Akademia Nauk
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
Zakład Biologii Molekularnej
Zespół Biologii Molekularnej Żelaza

mgr inż. Anna Milczarek

Autoreferat rozprawy doktorskiej p.t.

Rola dysmutazy ponadtlenkowej 1 (SOD1) w regulacji metabolizmu żelaza u myszy
The role of superoxide dismutase 1 (SOD1) in the regulation of iron metabolism in mice

Promotor: prof. dr hab. Paweł Lipiński

Recenzenci:

1. Prof. dr hab. Monika Kaczmarek
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań
Żywności PAN
2. Prof. dr hab. Mikołaj Gralak
3. Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Finansowanie: grant NCN nr.2011/01/B/NZ3/00632

Jastrzębiec, 2022

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską:

1. **Milczarek A**, Starzyński RR, Styś A, Jończy A, Staroń R, Grzelak A, Lipiński P. 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*. 2017;12(5):e0176800. IF=3,240; MNiSW=100
2. **Gajowiak A**, Styś A, Starzyński RR, Bednarz A, Lenartowicz M, Staroń R, Lipiński P: Mice Overexpressing Both Non-Mutated Human SOD1 and Mutated SOD1(G93A) Genes: A Competent Experimental Model for Studying Iron Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Molecular Neurosciences*. 2016;8:82. IF=5,639; MNiSW=140
3. **Gajowiak A**, Styś A, Starzyński RR, Staroń R, Lipiński P. Misregulation of iron homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2016;70(0):709-21. IF=0,878; MNiSW=40

Streszczenie

Poszczególne reaktywne pochodne tlenu cząsteczkowego (O_2), efektorowe cząsteczki stresu oksydacyjnego, wpływają na homeostazę żelaza w zróżnicowany sposób. Anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), produkt jednoelektronowej redukcji O_2 jest generowany w trakcie stresu oksydacyjnego przez różne układy enzymatyczne ale jest również produktem ubocznym metabolizmu tlenu w mitochondriach. Za paradygmat toksycznego działania $O_2^{\cdot-}$ powszechnie uważa się jego udział w redukcji jonów żelazowych do żelazawych, które w reakcji Fentona generują niezwykle toksyczny rodnik wodorotlenowy ($\cdot OH$). Ewolucyjnym antidotum na zależną od $O_2^{\cdot-}$ toksyczność okazało się powstanie enzymów z rodziny dysmutaz ponadtlenkowych, katalizujących konwersję $O_2^{\cdot-}$ do nadtlenu wodoru (H_2O_2) i O_2 , a wśród nich zależnej od jonów Cu i Zn dysmutazy ponadtlenkowej 1 (SOD1). Jednym z zaburzeń metabolizmu żelaza będących skutkiem obniżonej aktywności SOD1, jest obniżenie ekspresji białka IRP1 (*Iron Regulatory Protein 1*), regulującego wewnątrzkomórkową homeostazę żelaza, co wykazano na modelu myszy z nokautem genu *Sod1* (*Sod1*^{-/-}). W niniejszej rozprawie analizowano metabolizm żelaza myszy zarówno w warunkach zmniejszonej, jak i zwiększonej aktywności SOD1. W pierwszej części wykazano, że umiarkowane zmiany aktywności SOD1 zachodzące w trakcie ontogenezy myszy nie wpływają na metabolizm żelaza. Stwierdzono, że zaburzenie metabolizmu żelaza występuje tylko w warunkach braku aktywności SOD1 (co ma miejsce u myszy *Sod1*^{-/-} ale nie u osobników heterozygotycznych - *Sod1*^{+/-}) lub w warunkach indukowanego przez parakwat, zwiększonego uwalniania $O_2^{\cdot-}$ w makrofagach mysich. Ekspresja IRP1 nie ulega zmianie u płodów *Sod1*^{-/-}. W drugiej części rozprawy wykorzystano model myszy z nadekspresją ludzkiego zmutowanego genu *SOD1*^{G93A}. Mutacja G93A nie wpływa na aktywność enzymu, ale jest jedną z możliwych mutacji powodujących stwardnienie zanikowe boczne (ALS), neurodegeneracyjną chorobę występującą u ludzi. Myszy, do których genomu wprowadzono kopie ludzkiego genu *SOD1*^{G93A}, stanowią najczęściej używany w badaniach zwierzęcy model ALS. Opierając się na tym modelu postanowiono zidentyfikować zmiany występujące w metabolizmie żelaza, zależne od zwiększonej aktywności SOD1. Dodatkowo użyto myszy z nadekspresją normalnego ludzkiego genu *SOD1*. We wszystkich badanych tkankach zarówno myszy *SOD1* jak i *SOD1*^{G93A} odnotowano wzrost poziomu podjednostki H ferrytyny. Ten układ doświadczalny pozwolił również na identyfikację zmian metabolizmu żelaza specyficznych dla ALS. Za najważniejszą z nich uznano indukcję genu *Hmox1*, kodującego oksygenazę hemową 1 (HO1), enzym biorący udział w biodegradacji hemu, o szerokim spektrum działania cytoprotekcyjnego i antyoksydacyjnego. Indukcję genu *Hmox1* stwierdzono w tkankach dotkniętych ALS, myszy z wyraźnymi symptomami rozwijającej się patologii w postaci niedowładu kończyn tylnych. Co więcej, analiza immunohistofluorescencyjna preparatów rdzenia kręgowego myszy symptomatycznych *SOD1*^{G93A} pozwoliła stwierdzić, że wzrost ekspresji HO1 jest charakterystyczny tylko dla proliferujących komórek mikrogleju (a nie neuronów ruchowych), co sugeruje występowanie reakcji zapalnej w przebiegu ALS.

Summary

Individual reactive oxygen species, effector molecules of oxidative stress, differently influence cellular iron homeostasis. Superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), a product of the one-electron reduction of molecular oxygen (O_2), is generated during oxidative stress by various enzymatic systems but also is a by-product of normal oxygen metabolism in mitochondria. A long-standing paradigm of the $O_2^{\bullet-}$ -mediated toxicity proposes that it is the factor reducing ferric to ferrous ions, active in the generation of an extremely toxic hydroxyl radical ($\bullet OH$) via a Fenton reaction. The enzymatic activity of superoxide dismutases (including Cu,Zn-SOD, SOD1) that catalyze the conversion of $O_2^{\bullet-}$ to H_2O_2 and O_2 turned out to be an evolutionary remedy for the $O_2^{\bullet-}$ -dependent toxicity. One of disturbances in iron metabolism resulting from the reduced SOD1 activity (as demonstrated in SOD1 knock-out, *Sod1*^{-/-} mice), is down-regulation of the expression of iron Regulatory Protein 1 (IRP1), the master regulator of intracellular iron balance. In the present thesis, an attempt was made to analyze iron metabolism both in conditions of deficient and excessive SOD1 activity. In the first part, it was demonstrated that moderate changes in SOD1 activity occurring during ontogenesis in mouse do not influence iron metabolism. Misregulation of iron metabolism occurs only either under conditions of drastically reduced SOD1 activity (which is the case of *Sod1*^{-/-} but not *Sod1*^{+/-} mice) or when the production of $O_2^{\bullet-}$ is strongly induced by paraquat in mouse macrophages. Interestingly, IRP1 expression is not affected in *Sod1*^{-/-} embryos. In the further part of this thesis, studies were conducted on mice overexpressing human mutated *SOD1*^{G93A} gene. G93A mutation does not alter the enzymatic activity of SOD1 but is one of possible mutations causing amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a neurodegenerative human disease. Mice overexpressing *SOD1*^{G93A} gene are the most frequently used animal model in ALS research. Using this model it was decided to identify changes in iron metabolism associated with the increased enzymatic activity of SOD1. In addition, mice overexpressing normal *SOD1* gene were used in parallel. A substantial upregulation of H-ferritin subunit protein in all analyzed tissues in both *SOD1* and *SOD1*^{G93A} mice was noticed. This experimental design allowed also for an identification of changes in iron metabolism specific for the ALS pathology itself and independent of increased SOD1 activity. Most important of them is induction of the *Hmox1* gene encoding for heme oxygenase 1 (HO1), an enzyme responsible for heme breakdown, showing a wide spectrum of cytoprotective and antioxidant activities. HO1 induction was found in tissues affected by ALS in mice showing symptoms of paresis of the hind limbs. Furthermore, the induction of HO1 in the spinal cord of these mice was localized in proliferating microglia cells and not in motor neurons as assessed by immunofluorescence analysis. This observation suggests occurrence of inflammatory reaction in the course of ALS.

1. Wstęp

1.1. *Biologiczne znaczenie żelaza*

Dzięki swoim właściwościom oksydo-redukcyjnym żelazo jest funkcjonalnym komponentem grup prostetycznych, takich jak hem, centra żelazowo-siarkowe [Fe-S] oraz 1- lub 2-atomowe centra żelazowe, które determinują funkcje i aktywności wielu białek niezbędnych do prawidłowego przebiegu głównych procesów biologicznych w komórce i w skali całego organizmu. Z drugiej strony, te same właściwości żelaza determinują jego toksyczność. Biochemicznym podłożem toksyczności jonów żelaza jest interakcja z reaktywnymi, częściowo zredukowanymi pochodnymi tlenu cząsteczkowego (O_2), takimi jak nadtlenek wodoru (H_2O_2) i anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), w wyniku której powstaje rodnik wodorotlenkowy ($\cdot OH$), jedna z najbardziej reaktywnych chemicznie cząsteczek istniejących w przyrodzie, posiadająca silne właściwości utleniające i reagująca z większością związków organicznych [80]. Pojawienie się tlenu w atmosferze Ziemi przed około miliardem lat było bezpośrednio związane z procesem fotosyntezy u sinic [84]. Od tego czasu, przez kolejne około 300 mln lat, tlen osiągnął znaczące stężenie w środowiskach zasiedlonych przez organizmy żywe i stał się dla nich substratem do pozyskiwania energii uwalnianej w czasie procesu fosforylacji oksydacyjnej, wykorzystywanej następnie do syntezy ATP. Pojawienie się tlenu w atmosferze ziemskiej stało się istotnym zagrożeniem dla udziału żelaza w procesach biochemicznych. O ile bowiem jon żelazawy Fe^{2+} jest rozpuszczalny w roztworach fizjologicznych, o tyle jon żelazowy Fe^{3+} , dominująca forma jonowego żelaza w środowisku tlenowym, praktycznie nie tworzy roztworów wodnych. Jedną z ewolucyjnych strategii ograniczających niekorzystne oddziaływanie między tlenem a żelazem okazał się rozbudowany system białek swoiście wiążących jony żelaza. Z jednej strony, zapewniają one rozpuszczalność jonów Fe^{3+} , a tym samym umożliwiają transport żelaza w płynach biologicznych, jego przemieszczanie przez błony biologiczne, dostarczenie w odpowiedniej ilości do miejsc przeznaczenia w komórce i w organizmie, czyli do białek zależnych od jonów żelaza, pełniących różnorodne funkcje metaboliczne. Z drugiej strony, ten ściśle regulowany obieg żelaza w komórce i w organizmie znacznie ogranicza toksyczność żelaza.

1.2 *Komórkowy metabolizm żelaza*

W większości komórek ssaków homeostaza żelaza jest wynikiem skoordynowanego przebiegu kilku procesów: transportu żelaza do komórki i do poszczególnych organelli, jego magazynowania oraz transportu do środowiska pozakomórkowego. Procesy te mają zapewnić

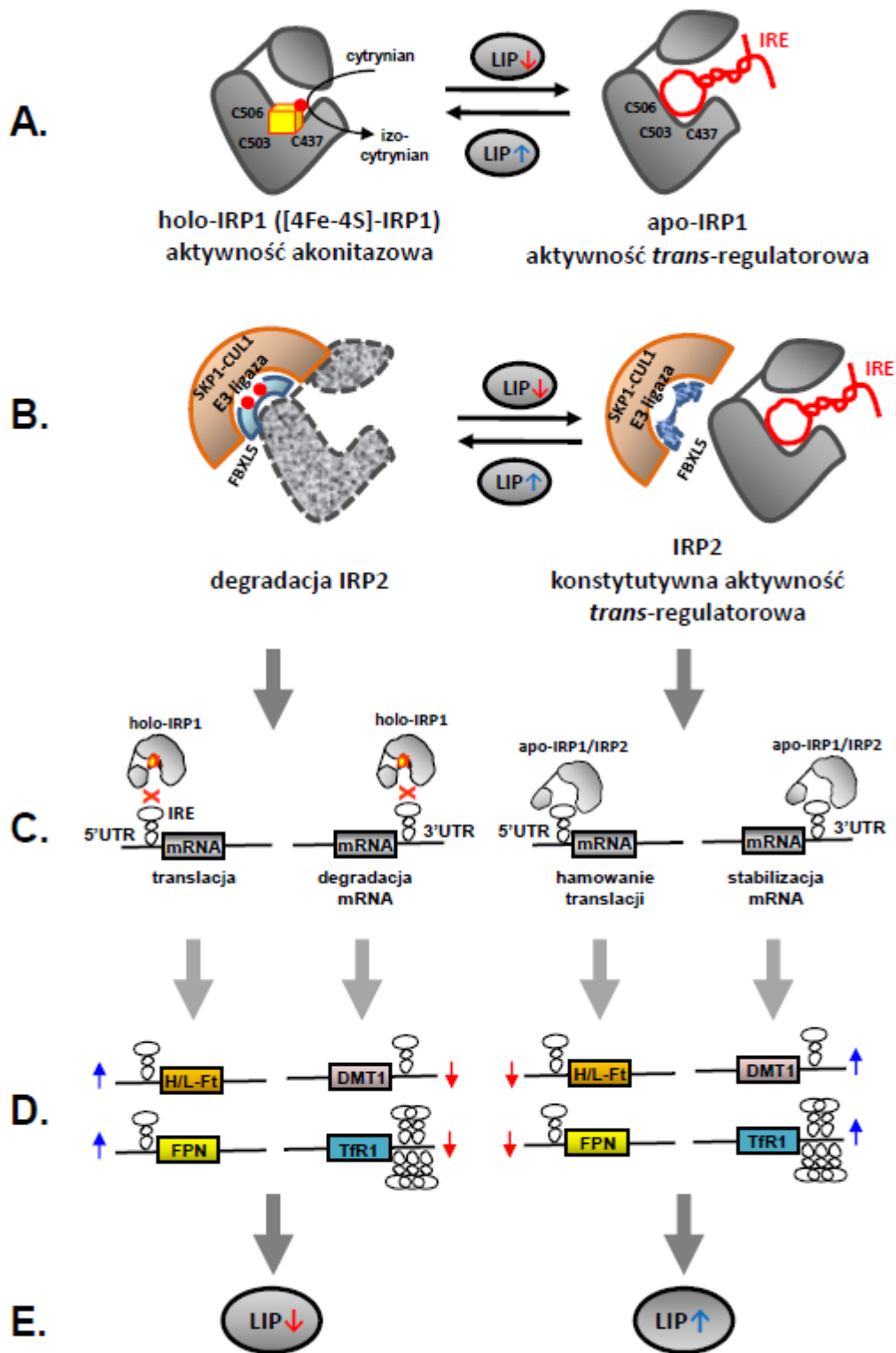
optymalne wykorzystanie żelaza do syntezy hemu i centrów [Fe-S] oraz ograniczyć jego toksyczność. Uczestniczą w nich liczne białka, spośród których do najlepiej poznanych należą receptor transferyny 1 (TfR1), białko, dzięki któremu zdecydowana większość komórek ssaków, na drodze endocytozy, pobiera żelazo związane z transferyną (Tf) [74], transporter metali dwuwartościowych 1 (*divalent metal transporter 1*, DMT1), transporter żelaza z endosomu do cytoplazmy [2], ferrytyna (Ft), białko magazynujące żelazo, wszechobecne w komórkach organizmów żywych [35] oraz ferroportyna (Fpn), transporter żelaza jonowego z komórek do środowiska pozakomórkowego [25]. Stałą frakcją żelaza w komórkach jest cytoplazmatyczna, zmienna pula żelaza (*labile iron pool*, LIP) [43]. LIP występuje również w mitochondriach, endosomach, lizosomach i w jądrze komórkowym [72] i jest frakcją jonów Fe^{2+} i Fe^{3+} związanych z niskocząsteczkowymi ligandami, wykazującymi niewielkie powinowactwo do tych postaci żelaza jonowego. Cytoplazmatyczna LIP jest pulą, która leży na skrzyżowaniu komórkowych szlaków metabolicznych żelaza. Jest zasilana przez żelazo transportowane do komórki oraz przez żelazo pochodzące z rozpadu wewnątrzkomórkowych białek wiążących ten metal. Pula ta jest źródłem żelaza do syntezy hemu i centrów [Fe-S]. Ponieważ LIP jest głównym źródłem żelaza czynnego w generowaniu rodnika $\cdot OH$ [48], w warunkach fizjologicznych jego stężenie w tej puli jest utrzymywane na możliwie najniższym poziomie (0,1-1,2 μM w zależności od typu komórki [43]), takim jednak, który zapewnia płynny przebieg reakcji biochemicznych, dla których niezbędny jest ten metal. Głównym białkiem regulującym poziom LIP jest ferrytyna, zachowane w ewolucji, cytoplazmatyczne białko, którego cząsteczka przypomina wydrążoną kulę, we wnętrzu której deponowane jest żelazo w postaci polimeru uwodnionego tlenku żelazowego, stanowiącego mineralny rdzeń ferrytyny. Białkowa powłoka ferrytyny jest heteropolimerem składającym się z 24 podjednostek dwóch typów: H (*heavy*, H-Ft, łańcuch ciężki) i L (*light*, L-Ft, łańcuch lekki), zróżnicowanych funkcjonalnie i kodowanych przez odrębne geny. Podjednostka H-Ft ma aktywność ferrokazydazową i bierze udział w utlenianiu jonów Fe^{2+} do Fe^{3+} , co stanowi pierwszy etap wiązania żelaza przez cząsteczkę ferrytyny. W podjednostce L znajduje się specyficzne miejsce, w którym zawiązuje się mineralny rdzeń ferrytyny [35]. Żelazo jest dostarczane do ferrytyny przy udziale białka opiekuńczego PCBP1 (*poly (rC) binding protein 1*) [87]. Jedna cząsteczka ferrytyny może wiązać do 4 500 atomów żelaza. Tym samym ferrytyna jest najbogatszym źródłem żelaza w komórce. Uwalnianie żelaza z ferrytyny odbywa się poprzez jej degradację na drodze autofagii (ferrytynofagii) przy udziale białka NCOA4 (*nuclear receptor coactivator 4*). Jest to proces homeostatyczny, który przyczynia się do utrzymania właściwego stężenia żelaza w cytoplazmatycznej LIP [83]. Wahania stężenia

żelaza w LIP, które stanowi zaledwie 3-5% całkowitego żelaza zawartego w komórce są wskaźnikiem komórkowego niedoboru lub nadmiaru tego pierwiastka i czułym impulsem oddziałującym na mechanizmy regulujące wewnątrzkomórkową homeostazę żelaza, a wśród nich na potranskrypcyjny mechanizm oparty na aktywności białek IRPs (*Iron Regulatory Proteins*). Bez względu na typ komórek, dwa cytoplazmatyczne białka IRP1 i IRP2 kontrolują syntezę podjednostek Ft, TfR1, DMT1 i Fpn poprzez wiązanie się z sekwencjami reagującymi na jony żelaza (*Iron Responsive Elements; IRE*), strukturami RNA występującymi w niepodlegających translacji rejonach 3' i 5' (*untranslated region, UTR*) RNA kodujących te białka [78,94]. IRP1 jest białkiem dwufunkcyjnym, które występuje jako akonitaza, enzym zawierający katalityczne centrum [4Fe-4S] (holo-IRP1) lub jako białko wiążące się do IRE, pozbawione tego centrum (apo-IRP1) [92,100]. Dwie aktywności IRP1 wzajemnie się wykluczają i są przeciwstawnie regulowane przez jony żelaza zawarte w LIP. Przy niedoborze żelaza dominującą postacią IRP1 w komórce jest apo-IRP1, które wiąże się do sekwencji IRE w regionie 5'UTR mRNA podjednostek Ft i Fpn i hamuje ich translację w wyniku zablokowania rekrutacji małej podjednostki rybosomu. Wiązanie się IRP1 do sekwencji IRE w regionie 3'UTR mRNA TfR1 i DMT1 stabilizuje te mRNA, prowadząc do wzrostu poziomu kodowanych przez nie białek. Odwrotna regulacja syntezy białek wynikająca z braku wiązania holo-IRP1 do IRE występuje, gdy stężenie żelaza w LIP w komórce jest wysokie [78,92,94,100]. Mimo znacznego podobieństwa aminokwasowego IRP2 do IRP1, IRP2 nie posiada centrum [Fe-S] i nie wykazuje aktywności akonitazowej [31]. Potencjał wiązania się IRP2 do IRE jest determinowany przez jego poziom w cytoplazmie, który jest regulowany przez białko FBXL5 (*F box and leucine-rich repeat protein 5*), inicjujące degradację IRP2 w proteasomach [81,98]. FBXL5 należy do rodziny białek adaptorowych, które wiążą specyficznie białka, wśród nich IRP2, będące substratami dla kompleksu SKP1-CUL1-F-box1 ligaz ubikwitynowych. FBXL5 ma domenę hemerytrynową, charakterystyczną dla rodziny białek wiążących żelazo i tlen u bakterii i bezkręgowców. Wiązanie żelaza przez hemerytrynę stabilizuje FBXL5; brak wiązania żelaza wywołany jego niedoborem w komórce wywołuje degradację FBXL5. Tym samym w komórkach o podwyższonym stężeniu żelaza FBXL5 wiąże się z IRP2 i ukierunkowuje jego degradację w proteasomach, co w odniesieniu do regulacji syntezy Ft, Fpn, TfR1 i DMT1 ma ten sam skutek, co regulacja przez holo-IRP1. Przy niedoborze żelaza poziom IRP2 ulega stabilizacji (ze względu na niski poziom FBXL5 w komórce), co powoduje zablokowanie syntezy podjednostek Ft i Fpn oraz stabilizację mRNA TfR1 i DMT1, a więc analogiczny skutek do regulacji przez apo-IRP1. Zarówno przy niedoborze jak i nadmiarze jonów żelaza

następstwem regulacji syntezy Ft, Fpn, TfR1 i DMT1 przez IRP1 i IRP2 jest szybki powrót do fizjologicznego poziomu LIP [78]. W regulacji metabolizmu żelaza w warunkach fizjologicznych *in vivo* oraz w odpowiedzi na wahania poziomu żelaza, pierwszoplanową rolę odgrywa IRP2 [57]. IRP1, którego dominującą (80-90%) postacią w komórkach jest holo-IRP1, zawierające centrum [4Fe-4S], jest białkiem odpowiedzialnym za adaptację metabolizmu żelaza do warunków stresu oksydacyjnego [62] i nitrozacyjnego [95].

Rysunek 1. Regulacja wewnątrzkomórkowej homeostazy żelaza przez IRP1 i IRP2. (A)

Zmiana aktywności IRP1 (aktywność akonitazowa *versus* aktywność *trans*-regulatorowa) determinowana jest obecnością klastra [4Fe-4S] w cząsteczce IRP1 i zależy od stężenia żelaza w labilnej puli żelaza (LIP). C507, C503, C437 – reszty cysteinowe w cząsteczce IRP1 koordynujące centrum [4Fe-4S], a przy jego braku wiążące się z sekwencją IRE (*Iron Responsive Element*). „Czerwona kropka” - atom żelaza determinujący aktywność enzymatyczną IRP1; **(B)** Poziom IRP2 regulowany jest przez kompleks białkowy SKP1-CUL1-FBXL5. W obecności żelaza domena hemerytrynowa FBXL5 wiąże 2 atomy żelaza (czerwone kropki), co powoduje stabilizację kompleksu katalizującego ubikwitynację IRP2 i jego degradację w proteasomach. Brak wiązania żelaza przez domenę hemerytrynową FBXL5, czyni to białko wrażliwym na proteasomalną degradację; **(C)** Mechanizm regulacji ekspresji transkryptów przez holo-, apo-IRP1 i IRP2 w zależności od lokalizacji sekwencji IRE w rejonach niepodlegających translacji (*untranslated regions*, UTR) 3' lub 5'; **(D)** Regulacja ekspresji mRNA H-, L-Ft (podjednostek ferrytyny), Fpn (ferroportyny), DMT1 (transportera metali dwuwartościowych 1) i TfR1 (receptora transferyny 1) przez holo- i apo-IRP1 zgodnie z lokalizacją sekwencji IRE w 3' lub 5' UTR. Transkrypt TfR1 zawiera 5 sekwencji IRE w 3'UTR [9]; **(E)** Zmiana poziomu LIP stosowna do zmiany poziomów Ft (wewnątrzkomórkowe magazynowanie żelaza), Fpn (eksport żelaza z komórki), TfR1 (transport żelaza do komórki) i DMT1 (transport żelaza z endosomu do cytoplazmy) będących konsekwencją aktywności IRP1.

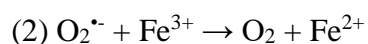
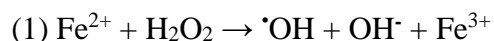


Integralnym elementem wewnątrzkomórkowej homeostazy żelaza jest metabolizm hemu [52]. Hem jest związkiem żelaza z protoporfiryną IX. Jest to układ makrocykliczny, w którym cztery pierścienie pirolowe połączone są grupami metinowymi (=CH-). Jon żelaza jest skoordynowany centralnie z czterema atomami azotu pierścieni pirolowych poprzez dwa

wiązania koordynacyjne i dwa kowalencyjne. Synteza hemu jest dobrze poznanym procesem odbywającym się na przemian w cytoplazmie i mitochondriach [1]. Ostatnim enzymem w tym cyklu, odpowiedzialnym za włączanie jonu Fe(II) do pierścienia protoporfiryny IX jest ferrochelataza (Fech), zawierająca centrum [2Fe-2S] [13]. Biodegradacja cząsteczek hemu, prowadząca do uwolnienia jonów Fe z protoporfiryny IX odbywa się przy udziale enzymów z rodziny oksygenaz hemowych (HO): konstytutywnego (HO2) i indukowalnego (HO1) [54]. Badania ostatnich lat wskazują na istnienie u ssaków rozbudowanego systemu białek biorących udział w wewnątrzkomórkowym transporcie hemu przez błony komórkowe oraz w usuwaniu hemu do środowiska pozakomórkowego [86]. Biologiczna rola tego systemu białek ma szczególne znaczenie w przypadkach wzrostu stężenia wolnego hemu w komórkach o intensywnym metabolizmie hemu, takich jak makrofagi i erytroblasty.

1.3 Dysmutaza ponadtlenkowa 1 (*Superoxide dismutase 1, SOD1*)

Prawdopodobny mechanizm powstania rodnika $\cdot\text{OH}$ *in vivo* opisują dwie reakcje określane jako cykl Fentona [80], w nawiązaniu do obserwacji poczynionych przez niemieckiego chemika Henry J.H. Fentona, który pod koniec XIX w opisał silne właściwości utleniające mieszaniny soli żelazowych i H_2O_2 [22]. Pierwsza z tych reakcji to właściwa reakcja Fentona, druga ilustruje mechanizm regeneracji jonu Fe^{2+} przez $\text{O}_2^{\cdot-}$.



Jedną z ewolucyjnych strategii ograniczających niekorzystne oddziaływanie między tlenem a żelazem okazał się opisany powyżej ściśle regulowany obieg żelaza w komórce, który znacznie ogranicza udział jonów żelaza w reakcji Fentona, przeciwdziałając powstawaniu rodnika $\cdot\text{OH}$. Z drugiej strony, powstały enzymy przeciwutleniające, odpowiedzialne za neutralizację poszczególnych reaktywnych pochodnych tlenu biorących udział w cyklu Fentona. Do enzymów inaktywujących H_2O_2 należą katalaza, enzym o jednej z najwyższych stałej szybkości reakcji enzymatycznej, wykazujący podwójną aktywność katalazową i peroksydazową oraz peroksydazy i peroksyredoksyny [76]. Grupą enzymów eliminujących $\text{O}_2^{\cdot-}$ ze środowiska komórkowego i pozakomórkowego są dysmutazy ponadtlenkowe [106]. U ssaków do grupy tej należą dysmutaza ponadtlenkowa 1 (*superoxide dismutase 1, SOD1, Cu,Zn-SOD*), enzym występujący w cytoplazmie komórek ssaków, SOD2 (Mn-SOD), enzym występujący w macierzy mitochondrialnej oraz SOD3 (Cu,Zn-SOD), enzym o większej masie molowej niż SOD1, występujący na błonie komórkowej, który może być uwalniany do środowiska pozakomórkowego. Będąca przedmiotem tej rozprawy SOD1 (oksydoreduktaza

ponadtlenek: ponadtlenek; ang. *superoxide: superoxide oxidoreductase*; E.C. 1.15.1.1) jest enzymem katalizującym dwustopniową reakcję dysmutacji (dysproporcjonacji) anionorodnika ponadtlenkowego wg następującego schematu:

1. $\text{SOD1-Cu}^+ + \text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{SOD1-Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$
2. $\text{SOD1-Cu}^{2+} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{SOD1-Cu}^+ + \text{O}_2$

SOD1 pojawiła się u pierwszych organizmów eukariotycznych przed ok. 1 mld lat (późny prekambry), gdy stężenie O_2 w atmosferze osiągnęło 1% dzisiejszej wartości. Zastąpiła ona dysmutazę ponadtlenkową zawierającą żelazo (FeSOD), która występowała u bakterii anaerobowych przed pojawieniem się znaczących ilości tlenu w atmosferze ziemskiej [4]. W komórkach ssaków cząsteczka SOD1 składa się z dwóch identycznych podjednostek (jest homodimerem). W strukturze każdej z podjednostek występuje mostek dwusiarczkowy (w podjednostce ludzkiej SOD1 między Cys57 i Cys146). Proces dimeryzacji podjednostek SOD1 nie jest poznany. Każda podjednostka ma masę cząsteczkową 32 kDa i posiada binuklearne miejsce wiązania atomów cynku (Zn) i miedzi (Cu). U ludzi gen *SOD1* jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 21 (21q22.1) (u myszy w chromosomie 16), składa się z 5 egzonów i koduje białko zawierające 154 aminokwasy. Zn stabilizuje centrum aktywne w podjednostkach SOD1, z kolei Cu, co uwidoczniło w zapisie reakcji, bierze bezpośredni udział w reakcji oksydoredukcyjnej. Atomy Cu dostarczane są do cząsteczek SOD1 przez białko opiekuńcze CCS (*copper chaperone for SOD1*) [104]. Stres oksydacyjny będący skutkiem zmniejszenia lub braku aktywności enzymatycznej SOD1 jest przyczyną wielu zaburzeń i patologii. Większość z nich udokumentowano w oparciu o model myszy z unieczynnionym genem *Sod1*. Należą do nich atrofia mięśni szkieletowych [63], utrata słuchu [45], anemia hemolityczna [41,91], rak wątrobowokomórkowy (*hepatocellular carcinoma*) [20], niepłodność u samic [56], skrócenie życia o ok. 30% [20,85].

1.4 Stwardnienie zanikowe boczne (*Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS*)

Mutacje występujące w genie *SOD1* są jedną z przyczyn nieuleczalnej choroby układu nerwowego – stwardnienia zanikowego bocznego (*Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS*) u ludzi [77]. Patologia ta występuje również pod nazwami: choroby Charcota (od nazwiska francuskiego lekarza Jean-Martin Charcot, który w XIX w. po raz pierwszy opisał przypadek ALS), choroby Lou-Gehriga (nazwa pochodząca od nazwiska bejsbolisty, który zmarł na ALS w 1941 r, nazwa używana głównie w USA), choroby neuronu ruchowego (nazwa odnosi się do grupy neuronów w korze mózgowej i w rdzeniu kręgowym, które ulegają uszkodzeniu w

ALS). ALS to postępująca choroba neurodegeneracyjna, która prowadzi do wybiórczego uszkodzenia obwodowego (dolnego) i ośrodkowego (górnego) neuronu ruchowego i charakteryzuje się zaburzeniem ruchu wskutek osłabienia, atrofii i przykurczu mięśni. Zdecydowana większość przypadków ALS u ludzi charakteryzuje się nieokreśloną etiologią. Jest to tzw. sporadyczna ALS (*sporadic ALS*, sALS). Od 5 do 10% przypadków ALS to przypadki uwarunkowane genetycznie, zakwalifikowane do grupy rodzinnej ALS (*familial ALS*, fALS) [96]. Spośród nich ok. 20% stanowią przypadki ALS uwarunkowane mutacjami w genie *SOD1*. Najbardziej nośną hipotezą dotyczącą patogenezy ALS wynikającej z mutacji genu *SOD1* jest zyskanie toksycznych funkcji (*gain of function*) przez nieprawidłowo sfałdowane (*misfolded*) białko. Skutkiem wadliwej konformacji cząsteczki SOD1 może być interakcja z prawidłowymi cząsteczkami SOD1 (w sposób podobny do białek prionowych), co sprzyja tworzeniu agregatów białkowych o toksycznym oddziaływaniu [37].

Głównymi modelami zwierzęcymi w badaniach nad ALS są transgeniczne myszy i szczury z nadekspresją genu *SOD1*, zawierającego mutacje punktowe, typu zmiany sensu, które wskazano jako mutacje odpowiedzialne za występowanie ALS u ludzi (*SOD1^{A4V}*, *SOD1^{H46R}*, *SOD1^{G93A}*). Zaburzenia metabolizmu żelaza, które mogą przyczyniać się do rozwoju ALS - zaburzenia występujące zarówno u pacjentów z ALS, jak i zwierząt modelowych, zostały szczegółowo opisane w artykule przeglądowym załączonym do niniejszej rozprawy (publikacja nr. 3) oraz w opracowaniu książkowym dotyczącym metabolizmu żelaza w mózgu [8]. W uzupełnieniu tych opracowań warto poruszyć wątek ferroptozy jako czynnika przyczyniającego się do śmierci neuronów ruchowych. Rola ferroptozy w patogenezie ALS stała się przedmiotem badań naukowych, których wyniki opublikowano po ukazaniu się artykułu przeglądowego Gajowiak i wsp., 2016 (publikacja nr. 3) [10,102]. Ferroptoza jest stosunkowo niedawno poznany nowym typem regulowanej śmierci komórkowej zależnej od żelaza, związanej z peroksydacją lipidów i niezależnej od apoptozy uwarunkowanej kaskadą kaspaz [15]. Peroksydaza glutationowa 4 (*glutathione peroxidase 4*, GPX4) jest selenozależnym enzymem, który reguluje przebieg ferroptozy, katalizując reakcję redukcji nadtlenków lipidów (L-OOH) do alkoholi (L-OH) w sposób zależny od zredukowanego glutationu (GSH). Ferroptozę hamują chelatory żelaza, spośród których najbardziej efektywnie działającym inhibitorem jest deferipron [15]. Chociaż inicjacja peroksydacji lipidów związana jest z aktywnym udziałem żelaza jego bezpośredni udział nie jest do końca poznany. Zarówno hemowe, jak i niehemowe żelazo jest aktywnym komponentem enzymów lipooksygenazy, oksydazy NADPH i oksydoreduktazy cytochromu P450, które bezpośrednio katalizują utlenianie kwasów wielonienasyconych do nadtlenków

lipidów [107,10]. Ważnym dowodem na udział żelaza i ferroptozy w patogenezie ALS jest terapeutyczne działanie chelatorów żelaza, w tym chelatorów przenikających do mózgu, co zaobserwowano w mysich modelach *SOD1^{G93A}* i *SOD1^{G37R}* [42,49,101]. Wydaje się również, że zwiększona aktywność głównego antyferroptotycznego enzymu – GPX4, łagodzi przebieg ALS u myszy. Stwierdzono to na podstawie porównania markerów ALS u myszy z nadekspresją genu *SOD1^{G93A}* oraz myszy z jednoczesną nadekspresją genów *SOD1^{G93A}* i *GPX4*. U tych drugich obserwowano zwiększoną przeżywalność, wzmożone funkcje motoryczne, mniejszą degenerację neuronów ruchowych w rdzeniu kręgowym oraz zmniejszoną peroksydację lipidów [10].

1.5 SOD1 a metabolizm żelaza – aktualny stan wiedzy

SOD1 jest istotnym elementem w systemach antyoksydacyjnych ssaków. Na kluczowe biologiczne znaczenie dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) przez SOD1, nie wpływa fakt jednoczesnego generowania w toku reakcji enzymatycznej katalizowanej przez SOD1 innej reaktywnej pochodnej tlenu – nadtlenu wodoru (H_2O_2). Od dawna przyjęty konsensus wokół istoty biologicznej aktywności SOD1 zakłada, że enzym ten eliminując ze środowiska wewnątrzkomórkowego $O_2^{\cdot-}$ ogranicza pulę żelaza chemicznie aktywnego w reakcji Fentona [59]. Ponadto w badaniach na bakteriach i drożdżach wykazano, że $O_2^{\cdot-}$ bierze aktywny udział w usuwaniu żelaza z klastrów żelazowo-siarkowych, będących kofaktorami wielu enzymów, w tym akonitazy mitochondrialnej [14,90]. Poprzez ten efekt $O_2^{\cdot-}$ może przyczyniać się do zwiększenia zawartości żelaza w LIP, a ochronne działanie SOD1 może ograniczać to zjawisko. Występujące u ssaków białko IRP1, kontrolujące wewnątrzkomórkową homeostazę żelaza, zawierające klaster [4Fe-4S] (holo-IRP1), określane często jako akonitaza cytoplazmatyczna jest też podatne na oddziaływanie $O_2^{\cdot-}$ [17]. Wykazano, że bezpośrednia interakcja $O_2^{\cdot-}$ z klastrem [4Fe-4S] powoduje usunięcie jednego atomu żelaza z klastra i prowadzi do pojawienia się formy [3Fe-4S]-IRP1 [7]. Jest to tzw. forma *null* IRP1, która pozbawiona jest aktywności akonitazowej ale nie posiada aktywności wiązania się z sekwencjami IRE występującymi w docelowych transkryptach i pod tym względem nie różni się od formy [4Fe-4S]-IRP1 [17].

Całkowicie nowy typ oddziaływania $O_2^{\cdot-}$ na metabolizm żelaza, o charakterze specyficznej regulacji, sugerują wyniki badań przeprowadzone w naszym zespole na myszach z nokautem genu kodującego SOD1 (KO SOD1, *Sod1^{-/-}*). Unieczynnienie genu *Sod1* u myszy prowadzi do wzrostu stężenia $O_2^{\cdot-}$ w komórkach tych zwierząt [29]. Równolegle wykazano,

że synteza IRP1 w wątrobie myszy *Sod1*^{-/-} jest obniżona w porównaniu do myszy kontrolnych zarówno na poziomie mRNA (~40%), jak i białka (~90%) [93]. SOD1 pełni szczególnie istotną rolę w dojrzałych erytrocytach pozbawionych mitochondrialnej SOD2. W wyniku badań naszego zespołu [91] oraz równoległe prowadzonych badań grupy z Japonii [41] stwierdzono, że u myszy z nokautem genu *Sod1* występuje ostra anemia hemolityczna. Brak aktywności SOD1 w erytrocytach wywołuje stres oksydacyjny, prowadzący do lizy tych komórek, co pociąga za sobą konsekwencje w postaci zaburzenia regulacji ogólnoustrojowego metabolizmu żelaza polegającego głównie na patologicznych zmianach występujących w wątrobie [91].

Mając na uwadze zależność pomiędzy aktywnością SOD1 a ekspresją genu *Irf1*, którą zaobserwowano w warunkach skrajnego niedoboru enzymu [93], w niniejszej pracy postanowiono sprawdzić, czy powiązanie to istnieje również w warunkach umiarkowanych zmian aktywności SOD1 zachodzących w trakcie ontogenezy u myszy z uwzględnieniem okresu prenatalnego. Podjęto również próbę alternatywnego podejścia metodycznego do badanego zagadnienia, czyli zbadano przy użyciu mysich makrofagów o konstytutywnej aktywności SOD1, czy wywołanie stresu tlenowego, w którym dominującą reaktywną pochodną tlenu jest O₂^{•-}, wpływa na zmiany ekspresji IRP1. Na koniec, z uwagi na fakt, że mutacja *SOD1*^{G93A} nie wpływa na aktywność enzymu, zbadano przy wykorzystaniu myszy z nadekspresją genu *SOD1*^{G93A} (jeden z najczęściej używanych w modeli zwierzęcych w badaniach nad ALS [33,53]), jak zwiększona aktywność SOD1 wpływa na metabolizm żelaza w wybranych tkankach myszy. Zastosowanie w doświadczeniach dodatkowej grupy kontrolnej myszy z nadekspresją niezmutowanego ludzkiego genu *SOD1*, pozwoliło na określenie specyfiki zmian metabolizmu żelaza zachodzących w ALS.

2. Hipoteza badawcza:

1. Zarówno brak, jak i zwiększenie aktywności SOD1, a także stres oksydacyjny, w którym dominującą reaktywną pochodną tlenu cząsteczkowego (O₂) jest anionorodnik ponadtlenkowy (O₂^{•-}), 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.

3. Cele pracy

1. Analiza poziomu białka IRP1 w wątrobie myszy w zależności od zmian aktywności SOD1 zachodzących w trakcie rozwoju pre- i postnatalnego.
2. Analiza poziomu białka IRP1 w wątrobie myszy o różnym, uwarunkowanym genetycznie poziomie ekspresji genu *Sod1*.
3. Analiza aktywności enzymatycznej (akonitazowej) i *trans*-regulatorowej IRP1 w makrofagach mysich traktowanych parakwatem, związkiem generującym anionorodnik ponadtlenny ($O_2^{\cdot-}$) oraz określenie zmian w ekspresji regulowanych przez IRP1 transkryptów, zawierających sekwencje IRE w regionach 5' lub 3' UTR
4. Porównanie ekspresji wybranych genów metabolizmu żelaza w tkankach 2- i 4-miesięcznych myszy z nadekspresją zmutowanego genu *SOD1^{G93A}*, odpowiednio niewykazujących i wykazujących objawy ALS oraz u myszy w tym samym wieku z nadekspresją normalnego ludzkiego genu *SOD1*.

4. Materiały i metody

4.1 Myszy

W publikacji nr. 1 opisano wyniki doświadczeń przeprowadzonych na myszach z nokautem genu *Sod1* (*Sod1^{-/-}*), myszach z jednym funkcjonalnym allelem *Sod1* (*Sod1^{+/-}*) oraz na myszach kontrolnych, „dzikich” (*Sod1^{+/+}*). Pary myszy szczepu, B6;129S7-*Sod1^{tm1Leb}*, heterozygotycznych pod względem mutacji *SOD1^{tm1Leb}* (*Sod1^{+/-}*) [56] pozyskano z Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Następnie heterozygotyczne samce i samice krzyżowano ze sobą a ich potomstwo genotypowano zgodnie z protokołem dostarczonym przez Jackson Laboratory (<https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=003881&protocolID=22288>). Zarodki i płody myszy pobierano z macicy po eutanazji matek w E14,5 i E18,5 życia płodowego. Przeprowadzano sekcje wątrób, które następnie genotypowano jak wyżej. Wykorzystanie w badaniach myszach z nadekspresją zmutowanego ludzkiego genu *SOD1* (0027626-B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J) zostało zatwierdzone przez Drugą Lokalną Komisję Etyczną w Warszawie w dniu 22 marca 2015 r. (uchwała nr WAW2/25/2015).

Heterozygotyczne myszy (samce i samice) z unieczynnionym allelem genu *Acol* (*Irp1^{+/-}*), szczepu Sv129/Ola/C57BL6/J) były udostępnione do badań przez Dr Bruno Galy i Dr Matthias W. Hentze (EMBL, Heidelberg, Germany). Myszy homozygotyczne pod względem niefunkcjonalnego allelu genu *Acol* (*Irp1^{-/-}*) oraz odpowiadające im myszy

kontrolne, „dzikie”, z dwoma czynnymi allelami genu *Acol* (*Irp1^{+/+}*) uzyskano w wyniku krzyżowania heterozygot *Irp1^{+/-}*. Genotypowanie potomstwa odbywało się na podstawie protokołu opisanego przez Gały i wsp. [24].

W publikacji nr. 2 użyto następujące myszy pozyskane z Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME): (i) samce, szczepu B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J, hemizygotyczne pod względem ludzkiego transgenu *SOD1^{G93A}*, ekspresujące zmutowaną formę SOD1 G93A, w której glicyna jest podstawiona przez alaninę w pozycji 93 [30]; (ii) samce szczepu B6SJL-Tg(SOD1)2Gur/J z transgenem ludzkiego normalnego genu *SOD1* (linia G1H o wysokiej liczbie kopii zmutowanego genu, charakteryzujące się około 4-krotnym zwiększeniem aktywności SOD1 (<https://www.jax.org/strain/002726>); (iii) nietransgeniczne samce szczepu B6129PF2/J, użyte jako myszy kontrolne. W doświadczeniach wykorzystano 2- i 4-miesięczne samce, co u osobników transgenicznych, ekspresujących zmutowany gen *SOD1^{G93A}* oznacza odpowiednio wiek, w którym nie występują objawy niedowładu kończyn oraz wiek, w którym te objawy pojawiają się.

4.2 Hodowle makrofagów

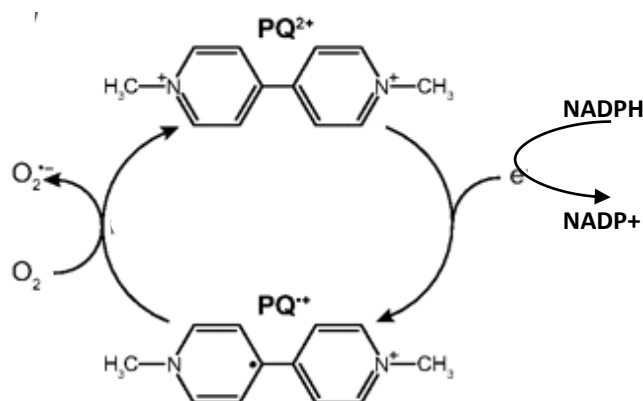
Mysie makrofagi RAW 264.7 są linią komórkową powstałą na bazie makrofagów uzyskanych z płynu otrzewnowego myszy z białaczką indukowaną wirusem Abelsona [75]. Linię tę otrzymano z American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Szczegółowy opis hodowli makrofagów RAW 264,7 przedstawiono w publikacji nr. 3.

Pierwotne makrofagi mysie izolowano ze szpiku kostnego (*bone marrow-derived macrophages*, BMDM) kości piszczelowej, udowej i ramiennej 2-miesięcznych myszy *Irp1^{+/+}* oraz *Irp1^{-/-}*. Szczegółowy opis procedur izolacji a następnie hodowli BMDM opisali Styś i wsp. [95]. Homogenność populacji BMDM sprawdzano przy użyciu techniki cytometrii przepływowej na podstawie identyfikacji białka F4/80, markera makrofagów [3]. Homogenność makrofagów pod koniec hodowli wynosiła ok. 99%.

4.3 Ekspozycja makrofagów na działanie parakwatu (PQ)

Makrofagi RAW 264.7 oraz BMDM były inkubowane przez 2 godziny w pożywce, do której dodano PQ (dichlorek 1,1'-dimetylo-4,4'-bipirydyniowy, stężenie końcowe 500 μ M), związek chemiczny, stosowany jako herbicyd, cyklicznie uwalniający anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$) [23] (Rycina 2). Po zakończeniu inkubacji w środowisku PQ makrofagi płukano PBS (*phosphate buffered saline*) a następnie hodowano w świeżej pożywce, bez PQ,

przez 3, 6, 9, 12, 16 i 24 godziny. Po zakończeniu hodowli, w wyznaczonych punktach czasowych, makrofagi przylegające do dna plastikowych płytek hodowlanych (Nunc) odrywano i izolowano z nich całkowite RNA, przygotowywano ekstrakty cytoplazmatyczne oraz ekstrakty wzbogacone w mitochondria według metodyki opisanej przez Bouton i wsp. [6].



Rysunek 2. Cykliczna produkcja anionorodnika przez parakwat (zmodyfikowano na podstawie Cocheme i Murphy [12]). Dwukation parakwatu (PQ²⁺) podlega w komórce jednoelektronowej redukcji, w wyniku czego powstaje jednowartościowy kationorodnik parakwatu (PQ^{•+}), który następnie szybko ($k=7,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [36]) reaguje z O₂, a następstwem tej reakcji jest powstanie anionorodnika ponadtlenkowego (O₂^{•-}) oraz regeneracja PQ²⁺, który ponownie podlega redukcji.

4.4. Pobieranie tkanek od myszy z nadekspresją SOD1

Myszy poddawano eutanazji poprzez przedawkowanie środka znieczulającego (dootrzewnowa iniekcja pentobarbitalu, w dawce 180mg/kg m.c.) po uprzedniej sedacji poprzez dootrzewnową iniekcję mieszaniny leków: ketaminy w dawce 50mg/kg m.c. oraz ksylazyny w dawce 5mg/kg m.c. Następnie pobierano tkanki: wątrobę, nerkę, śledzionę, rdzeń kręgowy, rdzeń przedłużony, najszerszy mięsień grzbietu i mięsień brzuchaty łydki. Tkanki po pobraniu płukano w PBS, następnie dzielone na małe kawałki, zamrażane w ciekłym azocie i deponowane do próbek mrozeniowych i przechowywano w temp. -80°C.

4.5. Pomiar aktywności SOD1

Aktywność SOD w całkowitych białkowych ekstraktach komórkowych i tkankowych oznaczano po elektroforetycznym rozdziale ekstraktów na żelu poliakrylamidowym. Żele inkubowano przez 30 min., bez dostępu światła w buforze zawierającym błękit nitrotetrazolowy i ryboflawinę. Wizualizacja aktywności SOD1 i SOD2 w postaci jasnych prążków na granatowym tle następowała po ekspozycji żelu na światło [5]. Rozróżnienia

między aktywnościami SOD1 i SOD2 dokonywano poprzez selektywne hamowanie aktywności SOD2 w obecności KCN [82].

4.6 Pomiar aktywności akonitazowej IRP1 w ekstraktach cytoplazmatycznych makrofagów

Aktywność akonitazową IRP1 w ekstraktach cytoplazmatycznych makrofagów oznaczano spektrofotometrycznie poprzez monitorowanie zaniku *cis*-akonitanu (pośredni produkt reakcji katalizowanej przez akonitazę) przy długości fali 240 nm ($\epsilon=3,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), na podstawie metodyki opisanej przez Drapier i Hibbsa [18].

4.7 Test opóźnionej migracji w żelu poliakrylamidowym (Electromobility Shift Assay, EMSA)

Aktywność *trans*-regulatorową IRP1 (aktywność wiązania się IRP1 do IRE) analizowano metodą EMSA opisaną przez Leibold i Munro [51] oraz Müllner i wsp. [65]. W skrócie, cytoplazmatyczne ekstrakty makrofagów (w ilości 1-4 μg białka) inkubowano w 20 μl buforu Munro z molarnym nadmiarem sondy IRE znakowanej [^{32}P]CTP, uprzednio transkrybowanej z plazmidu pSPT-fer (użyczonego przez dr Lukasa Kühna, (Swiss Institute for Experimental Cancer Research, Lozanna, Szwajcaria). W równoległe przygotowanych próbkach, ekstrakty cytoplazmatyczne inkubowano z 2% 2-merkaptotanołem przed dodaniem znakowanej sondy IRE, w celu wywołania pełnej aktywności wiązania się IRP1 do IRE [38]. Kompleksy IRE-białko rozdzielano na 6% żelu poliakrylamidowym. Po wysuszeniu żelu radioaktywny sygnał odpowiadający kompleksowi IRE-IRP1 poddawano ilościowej analizie przy użyciu Molecular Imager i zastosowaniu programu Quantity One (Bio-Rad).

4.8 Izolacja RNA i analiza Real-Time qPCR

Izolacje RNA z tkanek myszy wykonywano przy użyciu kolumnkowego zestawu *Roche High Pure RNA Tissue Kit* (Warszawa, Polska) zgodnie z załączoną instrukcją. Izolacje RNA z osadu makrofagów wykonano w oparciu o metodykę opisaną przez Chomczyńskiego i Sacchi [11]. Komórki poddano lizie w 1ml Trizolu. Po ekstrakcji chloroformem (0,2ml chloroformu na 1 ml Trizolu), RNA wytrącono w izopropanolu, a następnie przemywano 75% roztworem etanolu. Powstały po wirowaniu osad zawieszono w 50 μl wody wolnej od RNaz. RNA następnie oczyszczono z genomowego DNA przy użyciu RQ1 DNazy wolnej od RNaz (inkubacja 15 minut w 37°C). Po ekstrakcji mieszaniną fenol/chloroform (1:1), RNA wytrącano w mieszaninie 99.8% etanolu, 3M octanu sodu i glikogenu w temperaturze -80°C

przez 16 godzin. Następnie RNA przemywano kilkakrotnie 75% etanolem i ponownie zawieszono w 30µl wody wolnej od RNaz.

Pomiar stężenia otrzymanego RNA oszacowano spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm, z kolei czystość oszacowano na podstawie stosunku OD 260/280 i 260/230. Próby wyizolowanego RNA poddano elektroforezie w żelu agarozym (90V, 45min) celem oszacowania integralności RNA. 1µg całkowitego RNA wyizolowanego z tkanek myszy wykorzystano do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji, przy użyciu kitu *Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Warszawa, Polska) zgodnie z zamieszczoną instrukcją. Do reakcji wykorzystano losowe heksamery (6-cio nukleotydowe fragmenty ssDNA). Reakcje RT-qPCR przeprowadzono przy użyciu zestawu *Roche LightCycler®480 SYBR Green I Master* (Warszawa, Polska) i starterów specyficznych dla IRP1, H-, L-Ft, TfR1 (publikacja nr. 1) oraz TfR1 i HO1 (publikacja nr. 2), których sekwencje zamieszczono odpowiednio w publikacjach nr. 1 i 2. Uzyskane dane analizowano przy użyciu oprogramowania LightCycler®96. Specyficzność starterów potwierdzano w oparciu o analizę krzywych topnienia produktu reakcji RT-qPCR oraz analizę otrzymanych prążków w żelu agarozowym. Poziom ekspresji analizowanych genów normalizowano w odniesieniu do poziomu ekspresji genów referencyjnych kodujących: dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) i rybosomalną podjednostkę RNA 18S (*18S ribosomal RNA*, 18S RNA).

4.9 Przygotowanie ekstraktów białkowych i analiza Western Blot

W publikacji nr. 1 poziom badanych białek (SOD1, IRP1, H-Ft i L-Ft) analizowano w ekstraktach cytoplazmatycznych uzyskanych z fragmentów wątroby (lewego płata), nerek i osadu makrofagów, które homogenizowano w buforze do izolacji białek histydyna-sacharoza (His-Sach, z dodatkiem 2mM EDTA, 2mM PMSF i mieszaniny antyproteaz). Uzyskany homogenat wirowano (6000 x g, 15min, 4°C), a otrzymany supernatant przenoszono do próbek przeznaczonych do ultrawierowania. Osad pozostały po wirowaniu, ponownie zawieszano w buforze do izolacji, powtarzając procedurę wirowania. Uzyskany supernatant ponownie przenoszono do próbek wirówkowych i poddano ultrawierowaniu (36 000 obr/min, ultrawirówka Optima XPN-100, Beckman Coulter 45min, 4°C) celem uzyskania ekstraktów białkowych - frakcji błonowej i cytoplazmatycznej. Uzyskany po ultrawierowaniu supernatant (frakcja białek cytoplazmatycznych) przechowywano do dalszych badań w temp. -80°C.

W publikacji nr. 2 poziom badanych białek analizowano w ekstraktach całkowitych (SOD1), cytoplazmatycznych (IRP1, H-Ft i L-Ft) i błonowych (Fpn i HO1) uzyskanych z fragmentów rdzenia przedłużonego, rdzenia kręgowego, mięśni brzuchatego łydki i najszerszego grzbietu oraz wątroby i nerek. Frakcję (osad) białek błonowych (po odebraniu supernatantu uzyskanego w/g wyżej opisanej metodyki) ponownie zawieszono w buforze His-Sach i wytrząsano przez 45min w temp. 4°C celem rozdrobnienia osadu. Otrzymaną zawiesinę przechowywano w temp. -80°C. Celem otrzymania ekstraktów całkowitych, fragmenty tkanek homogenizowano w buforze RIPA, a otrzymany homogenat poddano wirowaniu (12000 obr/min, wirówka Eppendorf 5415R, 20min, 4°C).

Stężenie białka w otrzymanych ekstraktach tkankowych i komórkowych określono przy użyciu odczynnika Bradforda, wykorzystując albuminę surowicy bydlęcej (BSA) jako standard. Pomiar wykonano przy długości fali 595nm przy użyciu spektrofotometru DU[®]-68 Spectrophotometer (Beckman).

Ekstrakty białkowe zawieszano w buforze obciążającym Laemmli 4× i poddawano rozdzielaniu w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE (żel rozwijający 7-14% - 375 mM Tris-HCl, 0.1% SDS, pH 8.8; żel zagęszczający 5% - 125 mM Tris-HCl, 0.1% SDS, pH 6.8) w buforze do elektroforezy Western blot przy stałym napięciu 90V. Do przeprowadzenia rozdzielania użyto aparatu XCell SureLock[®] (Invitrogen). Po zakończeniu elektroforezy, dokonywano transferu białek z żelu na membranę PVDF (aktywowaną uprzednio metanolem) w buforze do transferu przy stałym natężeniu prądu (100 mA, 1,5godz. w przypadku pojedynczego żelu; 200mA, godz. w przypadku dwóch żeli) wykorzystując moduł XCell SureLock[®] (Waltham, MA USA). Efektywność transferu i integralność białek poddanych rozdzielaniu określano w oparciu o metodę barwienia żelu z wykorzystaniem czerwieni Ponceau, gdzie membranę PVDF po zakończonym transferze, inkubowano przez 5 minut w roztworze barwnika (0.1%(w/v) Ponceau S w 5%(v/v) kwasie octowym). Po odpłukaniu barwnika w 1×TTBS, membrany PVDF blokowano w roztworze 5% odtłuszczonego mleka w proszku w 1×TTBS w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę i inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi (wyszczególnionymi odpowiednio w publikacji nr. 1 i 2) w 1×TTBS w temp. 4°C przez 16 godzin. Następnie membrany płukano kilkakrotnie w buforze 1×TTBS celem pozbycia się niezwiązanego do membrany przeciwciała pierwszorzędowego. Membrany inkubowano z właściwymi przeciwciałami drugorzędowymi (wyszczególnionymi odpowiednio w publikacji nr. 1 i 2) w 1×TTBS w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Wizualizacji prążków dokonywano metodą

chemiluminescencyjną, wykorzystując zestaw Advansta *WesternBright ECL HRP* (San Jose, CA, USA). Kontrolę ilości białka zdeponowanego na żel, określono w oparciu o poziom ekspresji białka referencyjnego - β -aktyny lub tubuliny.

4.10 Barwienie depozytów żelaza błękitem pruskim w mięśni brzuchatym łydki (metoda Perlsa)

Fragmety utrwalone w płynie Bouin'a przez 24 godziny, przenoszono do roztworu 70% etanolu, który następnie sukcesywnie wymieniano, aż do wypłukania utrwalacza i zaniku charakterystycznej żółtej barwy. Tak przygotowane tkanki odwadniano, przeprowadzając przez szereg alkoholowy o wzrastającym stężeniu (roztwory etanolu 80% - 1,5h, 96% - 1,5h i 99.8% - 3×30min.). Tkanki przenoszono do roztworu zawierającego mieszaninę etanol 99.8% + toluen w stosunku 1:1, w którym inkubowano przez 30min., a następnie do mieszaniny toluen + parafina w stosunku 1:1 w temp. 37°C, w której ponownie inkubowano je przez 30 min. Tak wstępnie przepojone parafiną tkanki, przenoszono do gorącej parafiny (60°C) na 2 godziny, po czym pozostawiano w temperaturze pokojowej do zastygnięcia na 16 godzin. Następnego dnia tkanki zatopione w parafinie ponownie inkubowano w 60°C, aż do rozpuszczenia parafiny, po czym wysycone tkanki przenoszono do świeżej parafiny na kolejne 2 godziny. Po upływie tego czasu, bloczki parafinowe pozostawiono w temperaturze pokojowej, do zastygnięcia. Na szkiełka podstawowe nanoszono skrawki wątroby o grubości 7 μ m, uzyskane przy użyciu mikrotomu (Hyrax M25, Zeiss). Tkanki poddano deparafinizacji w ksylenie i hydratacji w szeregu alkoholowym (roztwór etanolu 99.8%, 70% i 30%, woda destylowana) a następnie inkubowano w roztworze roboczym zawierającym błękit pruski przez 45 minut, barwiono kontrastowo roztworem pararoseaniliny przez 3min. Wybarwione skrawki przeprowadzano przez szereg alkoholowy (roztwór etanolu 30%, 70% i 99.8%), wysycano w ksylenie i analizowano przy użyciu mikroskopu świetlnego Nikon Eclipse E600 microscopes (Nikon Instruments, Amsterdam, Niderlandy).

4.10 Analiza histologiczna tkanek myszy

Badanie histologiczne przeprowadzono na myszach trzech genotypów: myszach transgenicznym z wprowadzonym zmutowanym ludzkim genem *SOD1^{G93A}*, myszach transgenicznym z wprowadzonym ludzkim genem *SOD1* oraz na myszach dzikich kontrolnych.

Do badania pobrano od myszy następujące tkanki: mięsień łydki (*gastrocnemius muscle*), najszerszy mięsień grzbietu, wątrobę, nerkę. Bezpośrednio po pobraniu tkanki utrwalano w roztworze Bouin's przez 2 godz., a następnie zawieszano w 70% roztworze alkoholu etylowego. Tak utrwalone próby suszono i cięto przy użyciu mikrotomu Reichert-Jung (Reichert-Jung, Nussloch, Niemcy) na fragmenty o grubości 7 μ m w płaszczyźnie poprzecznej. Skrawki umieszczane na szkiełku podstawkowym i wybarwiano hematoksyliną i eozyną. Morfologia struktury mięśni została zbadana na mikroskopie świetlnym Olympus CH2 z wykorzystaniem obiektywów $\times 2$ i $\times 40$. Natomiast barwienie żelaza niehemowego w mięśniu łydki odbyło się przy pomocy Accustain Iron Deposition Kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Po umieszczeniu skrawków na szkiełku poddawano je inkubacji w roztworze z błękitem pruskim przez 30min., następnie kontrastowo wybarwiano roztworem pararozaniliny przez 2 minuty. Analiza wyników odbywała się z użyciem mikroskopu świetlnego Olympus CH2.

4.11 Analiza immunofluorescencyjna

Przedstawiono szczegółowy opis metodyki, gdyż nie była ona opisana w publikacji. Utrwalone fragmenty rdzenia przedłużonego zatapiało się w medium do zamrażania tkanek Cryomatrix (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), mrożono poprzez zanurzenie w ciekłym azocie i krojono na skrawki o grubości 20 μ m w kriostacie ((Leica Biosystems, Deer Park, IL, USA). Skrawki umieszczano na uprzednio przygotowanych szkiełkach podstawkowych, powleczonych roztworem żelatyny i siarczanu chromowo-potasowego i przechowywano w temperaturze -20°C. Skrawki na wyselekcjonowanych preparatach z rdzenia przedłużonego (myszy *SOD^{G93A}* i myszy kontrolnych, typu dzikiego) otaczano wodoodpornym markerem Dako Pen (Dako), następnie nawadniano PBS przez 10 minut. Tkanki poddawano permeabilizacji 0,1% roztworem Triton X-100 (Sigma) w PBS przez 20 minut. Następnie preparaty blokowano w 3% roztworze albuminy bydlęcej (BSA, Bioshop) w PBS przez 1,5 godz. Do wykrywania enzymu HO1 i białka markerowego mikrogleju Iba1 użyto następujących przeciwciał pierwszorzędowych: anti-HO1 (królicze poliklonalne, Enzo Life Sciences, #ADI-OSA150-F) oraz anti-Iba1 (królicze poliklonalne, Wako Chemicals, 019-19741, rozcieńczonych odpowiednio w proporcji 1:250 i 1:1000 w 3% BSA w PBS. Ponieważ przeciwciała pierwszorzędowe dla badanego białka i markera Iba1 były wytwarzane u tego samego gatunku (królika), do blokowania i znakowania przeciwciał pierwszorzędowych zastosowano protokół dla fragmentów AffiniPure Fab sprzężonych z

fluorochromem (Jackson Immunoresearch, Ely, Cambridgeshire, Wielka Brytania). Monowalentne fragmenty Fab przeciwciał drugorzędowych zastosowano do zablokowania powierzchni swoistych przeciwciał pierwszorzędowych. Ponieważ każdy znakowany fragment Fab ma tylko jedno miejsce wiązania antygeny, zapobiega to reakcjom krzyżowym między różnymi przeciwciałami drugorzędowymi. Białko HO1 wiązano ze specyficznymi przeciwciałami pierwszorzędowymi, które następnie blokowano i znakowano fragmentami Fab sprzężonymi z Cy3. Następnie białko markerowe Iba1 lokalizowano za pomocą przeciwciał pierwszorzędowych i znakowano standardowym przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z fluorochromem Alexa488. Skrawki inkubowano wraz z przeciwciałami anti-HO1 przez noc w wilgotnej komorze, w temperaturze pokojowej. Następnego dnia wypłukiwano niezwiązane przeciwciała 0,1% roztworem Triton X-100 w roztworze PBS. Preparaty płukano 5 × po 6 min., nakładano kozie anty-królicze fragmenty Fab znakowane fluorochromem Cy3 (Cy3-conjugated AffiniPure Fab Fragment, Jackson Immunoresearch, Ely, Cambridgeshire, Wielka Brytania) rozcieńczone w 3% roztworze BSA w PBS w proporcji 1:50. Preparaty inkubowano przez 1,5 godz. w wilgotnej komorze, w temperaturze pokojowej, chroniąc przed światłem. Następnie wypłukiwano niezwiązane fragmenty Fab 0,1% roztworem Triton X-100 w PBS, 5 × po 5 min., nakładano przeciwciało anty-Iba1 i inkubowano przez noc w wilgotnej komorze, w temperaturze pokojowej, chroniąc przed światłem. Następnego dnia wypłukiwano niezwiązane przeciwciała 0,1% roztworem Triton X-100 w PBS. Preparaty płukano 5 × po 6 minut. Następnie nakładano kozie anty-królicze przeciwciała drugorzędowe dla Iba1 sprzężone z fluorochromem Alexa488 (Jackson Immunoresearch, Ely, Cambridgeshire, Wielka Brytania) i inkubowano w wilgotnej komorze, w temperaturze pokojowej przez 1,5 godz. Następnie wypłukiwano niezwiązane przeciwciała drugorzędowe 0,1% roztworem Triton X-100 w PBS, 5 × po 5 minut. Na koniec nakładano PBS na okres 10 min., a następnie zamykano preparaty w medium Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), z dodatkiem DAPI barwiącym jądra komórkowe. Wykonano również próby negatywne dla preparatów z rdzenia przedłużonego myszy kontrolnych aby wykluczyć niespecyficzne wiązanie się przeciwciał drugorzędowych. Obserwację preparatów przeprowadzono na mikroskopie konfokalnym Zeiss LSM 710 Zeiss LSM 710 (Carl Zeiss, Oberkochen, Niemcy) przy użyciu obiektywu 40×. Zdjęcia mikroskopowe wykonano za pomocą programu Zeiss ZEN.

4.12 Analiza statystyczna

Analiza statystyczna dotycząca zmian poziomu ekspresji genów, poziomu białek, aktywności Sod1 oraz akonitazy (holo-Irp1) zamieszczonych w publikacji nr. 1 wykonana została za pomocą testu t-Studenta dla prób niezależnych. Uzyskane wartości $p < 0.05$ oraz $p < 0.01$ uznawano za istotne statystycznie. Analiza statystyczna dotycząca zmian poziomu ekspresji genów: *Tfr1* i *Hmox1* w tkankach pozyskanych od myszy eksprymujących zmutowaną formę *SOD1*^{G93A}, myszy z transgenem ludzkiego normalnego genu *SOD1* oraz myszy kontrolnych wykonana została w oparciu o dwuczynnikową analizę wariancji z następczym testem post hoc – test wielokrotnych porównań par średnich Tukeya (publikacja nr 2). Analizy wykonano z wykorzystaniem programu statystycznego Statistica (v.10 – publikacja nr 2; v.12 – publikacja nr 1).

5. Wyniki

5.1 Publikacja nr. 1 (Milczarek i wsp., 2017, PloS One)

W doświadczeniach będących przedmiotem publikacji nr. 1 analizowano zmiany w ekspresji IRP1 w wątrobie na poziomie białka w zależności od zmian aktywności SOD1, zachodzących w trakcie ontogenezy u myszy z uwzględnieniem okresu prenatalnego. Wyniki przedstawione na rycinie 1A wskazują, że poziom białka IRP1 nie jest skorelowany ze zmianami aktywności SOD1, które obejmują stosunkowo niewielki zakres (ok. 20U/mg białka). Badanie zależności: aktywność SOD1 *versus* poziom IRP1 w wątrobie dorosłych myszy trzech genotypów *Sod1*^{+/+}, *Sod1*^{+/-} i *Sod1*^{-/-} wskazuje, że tylko brak aktywności enzymatycznej SOD1 (u myszy *Sod1*^{-/-}) wywołuje obniżenie ekspresji IRP1 (rycina 1B-F). Zmniejszenie poziomu IRP1 oraz aktywności akonitazowej tego białka nie występuje u heterozygotycznych myszy *Sod1*^{+/-} (z jednym czynnym allelem genu *Sod1*), u których aktywność SOD1 jest zmniejszona o około 40% w porównaniu do myszy *Sod1*^{+/+}. Co ciekawe, zmniejszenie ekspresji IRP1 u 2-miesięcznych myszy *Sod1*^{-/-} [93], nie występuje w okresie płodowym. Poziom IRP1 w wątrobie płodów *Sod1*^{+/+} i *Sod1*^{-/-} w wieku E14,5 i E18,5 jest bardzo zbliżony (Rycina 2). Różnica pojawia się w pierwszym dniu życia postnatalnego i trwa przynajmniej do 70 dnia po urodzeniu.

W kolejnych doświadczeniach objętych publikacją nr. 1, przeanalizowano ekspresję i aktywność IRP1 w warunkach zwiększonego stężenia $O_2^{\cdot -}$ w komórkach o konstytutywnej aktywności SOD1, poprzez traktowanie ich parakwatem (PQ), związkiem chemicznym, którego metabolizm generuje cykliczne uwalnianie $O_2^{\cdot -}$ [12,23]. W mysich makrofagach linii RAW 264.7 inkubowanych przez 2 godziny z PQ, a następnie hodowanych w pożywece

pozbawionej PQ przez różne okresy, stwierdzono zmniejszony poziom IRP1. Do dalszych doświadczeń wybrano 6-godzinny okres hodowli komórek RAW 264.7 bez PQ, jako czas, po którym obserwowano najsilniejszy efekt PQ (Rycina 3A). W tym punkcie czasowym badano następnie nie tylko poziom IRP1 (Rycina 3B), ale również ekspresję mRNA IRP1 (Rycina 3C), aktywność akonitazową IRP1 (Rycina 3D) oraz aktywność *trans*-regulatorową - wiązanie się z sekwencją IRE (Rycina 3E). Wszystkie badane parametry były obniżone w porównaniu do komórek kontrolnych (nietraktowanych PQ).

Istotnym elementem dalszych doświadczeń było sprawdzenie, czy obniżenie i aktywności *trans*-regulatorowej IRP1 wpływa docelowo na ekspresję regulowanych przez IRP1 transkryptów zawierających sekwencje IRE w regionach 5' lub 3' UTR, czyli odpowiednio w mRNA podjednostki lekkiej ferrytyny (L-Ft) i mRNA receptora transferyny 1 (TfR1). Jako model komórkowy do badań wybrano makrofagi izolowane ze szpiku kostnego (*bone marrow-derived macrophages*, BMDM) myszy z nokautem genu *Irp1* (*Irp1*^{-/-}) i myszy kontrolnych (*Irp1*^{+/+}). Nie stwierdzono różnic w ekspresji mRNA L-Ft zarówno pomiędzy komórkami kontrolnymi (nietraktowanymi PQ) obu genotypów, jak i pomiędzy komórkami poddanymi działaniu PQ (Rycina 4A). Wykazano natomiast, że PQ wpływa na zwiększenie poziomu mRNA L-Ft w BMDM bez względu na to, czy ekspresują IRP1, czy nie (Rycina 4A). Podobny wzorzec regulacji (w komórkach nietraktowanych i traktowanych PQ) zaobserwowano w odniesieniu do poziomu białka L-Ft (Rycina 4B). W przypadku regulacji mRNA kodującego TfR1, w BMDM obu genotypów (*Irp1*^{-/-} i *Irp1*^{+/+}) nie odnotowano wpływu PQ, natomiast zaobserwowano tendencję wzrostu poziomu transkryptu (różnice nieistotne statystycznie) w zależności od genotypu makrofagów. Wyniki przedstawione na Rycinie 4 sugerują, że wzrost ekspresji L-Ft w komórkach poddanych działaniu PQ może być, po pierwsze, efektem regulacji transkrypcyjnej oraz, po drugie, efektem odblokowania translacji mRNA L-Ft zarówno wskutek konstytutywnego braku IRP1 (BMDM *Irp1*^{-/-}), jak i obniżonej przez PQ ekspresji IRP1 (BMDM *Irp1*^{+/+} traktowane PQ).

5.2 Publikacja nr. 2 (Gajowiak i wsp., 2016, *Frontiers in Molecular Neurosciences*)

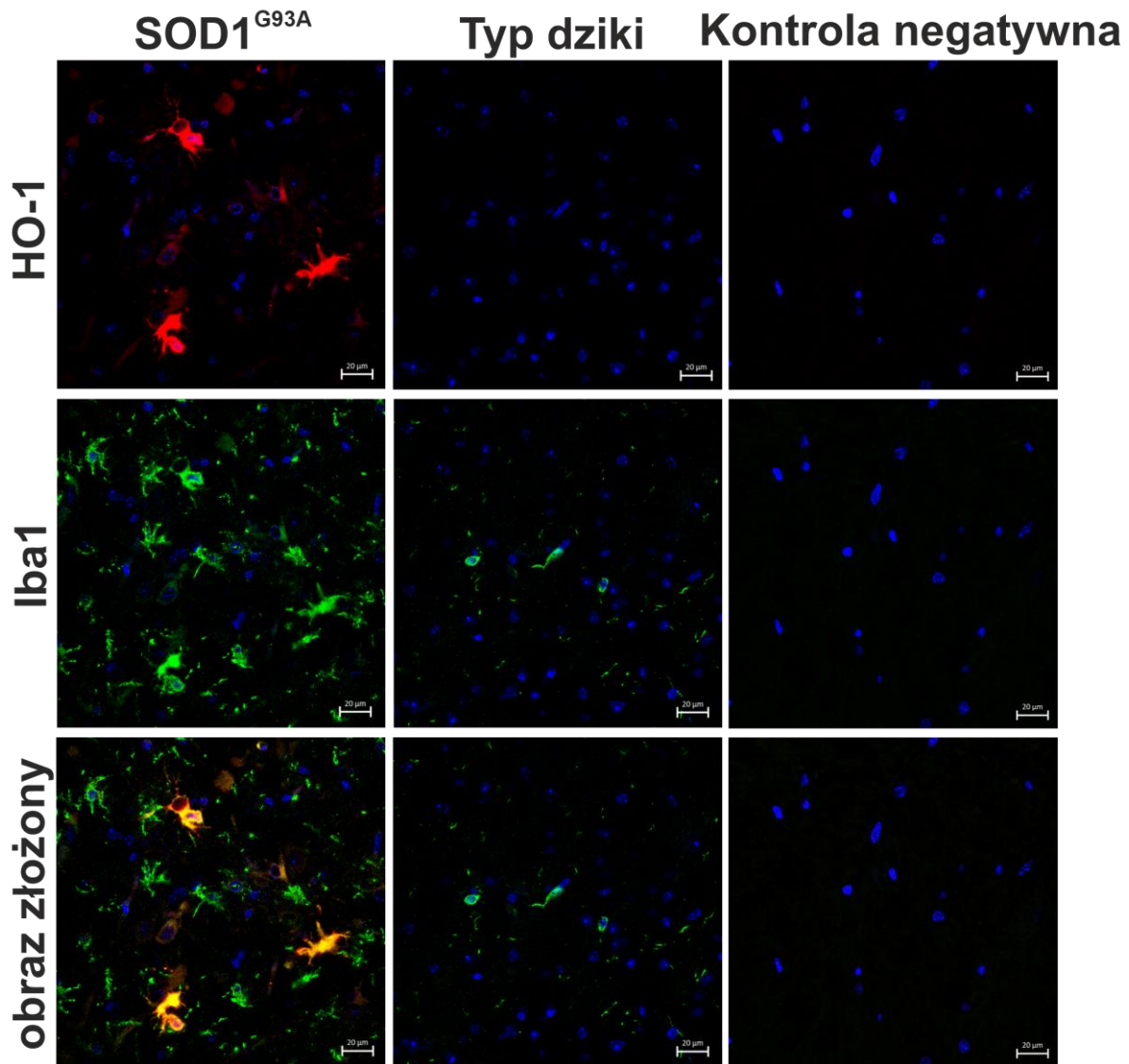
Wyniki doświadczeń opisanych w publikacji nr. 2 uzyskano w oparciu o transgeniczne myszy z nadekspresją zmutowanego ludzkiego genu *SOD1*^{G93A}, myszy z nadekspresją niezmutowanego genu *SOD1* oraz nietransgeniczne myszy kontrolne z tego samego szczepu B6129PF2/J. Mutacja *SOD1*^{G93A}, która stanowi molekularne podłoże ALS (*Amyotrophic Lateral Sclerosis*), nie skutkuje utratą aktywności enzymu, a duża liczba kopii zmutowanego genu wprowadzonych do genomu myszy determinuje podwyższoną aktywność enzymatyczną

SOD1 (<https://www.jax.org/strain/002726>). Z tego powodu w doświadczeniach użyto również jako specyficznej grupy kontrolnej myszy charakteryzujących się nadekspresją normalnego ludzkiego genu *SOD1*, które nie wykazują żadnych objawów ALS. Dopelnieniem układu doświadczalnego są myszy charakteryzujące się natywną (obniżoną w stosunku do myszy transgenicznych) aktywnością SOD1. Taki układ doświadczalny pozwala zidentyfikować zmiany metabolizmu żelaza wynikające z podwyższonej aktywności SOD1 i oddzielić je od zmian będących skutkiem wywołanej przez mutację patologii (ALS). Badania przeprowadzono na myszach w wieku 2 i 4 miesiące, co w odniesieniu do myszy z nadekspresją *SOD1^{G93A}* oznacza odpowiednio wiek, w którym nie występują jeszcze symptomy ALS oraz wiek, w którym pojawiają się pierwsze symptomy w postaci niedowładu tylnych kończyn. Pierwsza analiza polegała na sprawdzeniu aktywności SOD1 w tkankach wykazujących zmiany patologiczne charakterystyczne dla ALS mięśnie szkieletowe: najszerszy grzbietu i brzuchaty łydki oraz takie struktury jak rdzeń przedłużony, rdzeń kręgowy oraz w narządach, w których te zmiany nie występują, ale które odgrywają istotną rolę w ogólnoustrojowej homeostazie żelaza (wątroba, nerki). We wszystkich badanych tkankach i narządach aktywność SOD1 była znacznie podwyższona u myszy transgenicznych (dwóch genotypów) w porównaniu do myszy nietransgenicznych (Rycina 1). Nie wykazano różnic w aktywności SOD1 w poszczególnych tkankach pomiędzy myszami *SOD1* i *SOD1^{G93A}*. Analiza histologiczna mięśnia brzuchatego łydki (barwienie hematoksyliną-eozyną) wykazała występowanie zmian patologicznych wyłącznie u 4-miesięcznych, symptomatycznych myszy *SOD1^{G93A}* (Rycina 2C-F). Obraz histologiczny badanego mięśnia u 2-miesięcznych myszy z 3 grup oraz u 4-miesięcznych myszy *SOD1* i myszy kontrolnych (nietransgenicznych) nie wykazywał żadnych zmian w architekturze mięśnia (Rycina 2A-B). Podobnie, jedynie w obrębie tkanki mięśnia brzuchatego łydki symptomatycznych myszy *SOD1^{G93A}* stwierdzono występowanie depozytów żelaza (barwienie błękitem pruskim) (Rycina 3). Nawiązując do wyników publikacji nr. 1 (gdzie wykazano obniżenie ekspresji IRP1 w u myszy z *Sod1^{-/-}*), określono poziom IRP1 w przeciwstawnych warunkach podwyższonej aktywności SOD1. Bez względu na genotyp analizowanych myszy, w obrębie danej tkanki lub narządu ekspresja IRP1 pozostawała na podobnym poziomie (Rycina 4). Nie wykazano również różnic w tkankach lub narządach pochodzących od myszy w różnym wieku. Ciekawych obserwacji dostarczyła analiza ekspresji transkryptów L-Ft, H-Ft, i TfR1 regulowanych przez IRP1. Poziom białka L-Ft pozostawał niezmienny we wszystkich badanych tkankach/narządach pochodzących od myszy o trzech analizowanych genotypach. Z kolei, we wszystkich tkankach zarówno myszy 2- jak i 4-miesięcznych poziom H-Ft był

podwyższony u myszy *SOD1* i *SOD1^{G93A}* w porównaniu do myszy nietransgenicznych (Rycina 5). Wyniki te sugerują, że regulację tę można przypisać podwyższonej aktywności *SOD1*, a nie samej patologii ALS. Wyniki analizy ekspresji TfR1 na poziomie mRNA nie okazały się rozstrzygające. Poziomy transkryptu TfR1 oznaczone metodą RT-PCR wykazują tendencję spadkową we wszystkich analizowanych tkankach pochodzących od myszy *SOD1^{G93A}* w porównaniu do myszy *SOD1*. Jediną statystycznie istotną różnicę wykazano w mięśniu najszerszym grzbietu u symptomatycznych myszy *SOD1^{G93A}*. Brak różnic pomiędzy analizowanymi tkankami wykazano również w przypadku ekspresji ferroporyny (Fpn) i ceruloplazminy (Cp) na poziomie białka (Rycina 7), dwóch białek współdziałających w uwalnianiu żelaza z komórek do środowiska zewnątrzkomórkowego [64].

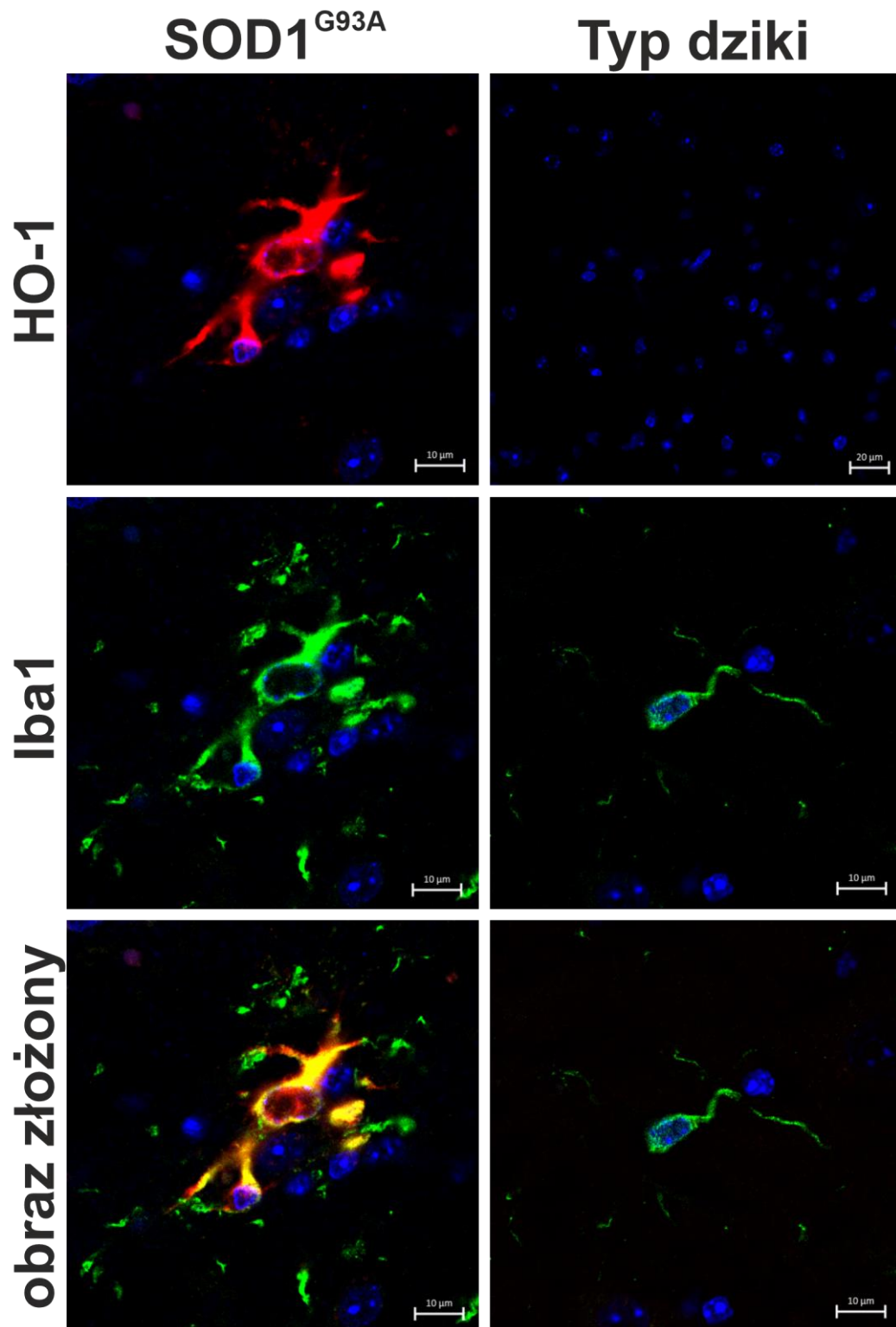
Prawdopodobnie najciekawsze wyniki zawarte w publikacji nr. 1 dotyczą ekspresji genu *Hmox1*, kodującego indukowalny enzym - oksygenazę hemową 1 (HO1). HO1 katalizuje degradację cząsteczki hemu a produktami tej reakcji są jony żelazawe (Fe^{2+}), tlenek węgla (CO) i biliwerdyna [46]. Ten ostatni produkt jest redukowany do bilirubiny, związku o właściwościach antyoksydacyjnych, w reakcji katalizowanej przez reduktazę biliwerdyny [67]. HO1 jest enzymem o niezwykle szerokim zakresie funkcji biologicznych, do których należą funkcje cytoprotekcyjne i antyoksydacyjne [47]. Analiza ekspresji genu *Hmox1* na poziomie mRNA wykazała specyficzną indukcję tego genu w mięśniach szkieletowych (najszerzy grzbietu, i brzuchaty łydki) oraz w rdzeniu kręgowym myszy *SOD1^{G93A}*, wykazujących symptomy ALS (Rycina 8A-C). Co istotne, analiza HO1 na poziomie białka wiernie odzwierciedla wzorzec ekspresji transkryptu. Dodatkowo, indukcję genu *Hmox1*, na poziomie mRNA i białka, odnotowano również w mięśniu brzuchatym łydki 2-miesięcznych myszy *SOD1^{G93A}*, niewykazujących symptomów ALS (Rycina 8A). Co istotne, wzrostu ekspresji genu *Hmox1* nie odnotowano w wątrobie myszy *SOD1^{G93A}* (Rycina 8D). Swoistym *post scriptum* wyników przedstawionych w publikacji nr. 2 jest immunofluorescencyjna (IF) analiza lokalizacji komórkowej HO1 w preparatach rdzenia kręgowego myszy *SOD1^{G93A}* i myszy kontrolnych. Wyniki analizy IF uzyskano już po opublikowaniu artykułu nr. 2 i są przedstawione poniżej na Rysunku 3. Zwiększoną ekspresję HO1 zlokalizowano wyłącznie w komórkach mikrogleju, co stwierdzono na podstawie kolokalizacji HO1 z markerem komórek mikrogleju – białkiem Iba1 [40].

A.



Rysunek 3. Kolokalizacja oksygenazy hemowej 1 (HO1) z białkiem Iba1 (*ionized calcium binding adaptor molecule*) w rdzeniu kręgowym myszy symptomatycznych z nadekspresją genu *SOD1^{G93A}* oraz myszy kontrolnych (myszy typu dzikiego). HO1 znakowane fluorochromem Cy3 (czerwony), białko Iba1 znakowane fluorochromem Alexa 488 (zielony), jądro komórkowe wybarwione DAPI (niebieski); (A) skala 20 µm; panel prawy próba negatywna preparatów nie inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem) wykonana dla preparatów z myszy kontrolnych, aby wykluczyć niespecyficzne wiązanie się przeciwciał drugorzędowych. (B) skala 10 µm (lewy panel).

B.



6. Dyskusja

Z biologicznego punktu widzenia zagadnienie interakcji między metabolizmami tlenu i żelaza stało się istotne od około 1 miliarda lat, gdy skutek procesu fotosyntezy u sinic stężenie O_2 w atmosferze ziemskiej zaczęło stopniowo rosnać [84]. Interakcja O_2 z Fe wpływa, z jednej strony, na ograniczenie biodostępności żelaza dla organizmów żywych, z drugiej, wiąże się z ryzykiem generowania rodnika wodorotlenowego ($\cdot OH$). Szczególnie rozbudowany w toku ewolucji system białek wiążących, transportujących, magazynujących, utleniających/redukujących jony żelaza [61], a także system enzymów przeciwutleniających, odpowiedzialnych za neutralizację częściowo zredukowanych, reaktywnych pochodnych O_2 , [76], zapewnia w komórkach organizmów sprawny przebieg procesów biochemicznych opartych na właściwościach oksydoredukcyjnych jonów żelaza, a jednocześnie ogranicza do minimum ryzyko wystąpienia stresu oksydacyjnego.

W niniejszej rozprawie badano zależność między dysmutazą ponadtlenkową 1 (SOD1), enzymem regulującym głównie w cytoplazmie komórek ssaków poziom anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot -}$), jednej z reaktywnych pochodnych tlenu, a wewnątrzkomórkowym metabolizmem żelaza. Na szerokim tle możliwych interakcji O_2 -Fe, jest to stosunkowo wąski zakres oddziaływań, jednak o dużym znaczeniu biologicznym. Z dotychczasowych ustaleń doświadczalnych wynika, że w obrębie tzw. labilnej puli żelaza (LIP), $O_2^{\cdot -}$ jest czynnikiem redukującym jony Fe(III) do jonów Fe(II), które biorą udział w reakcji Fentona [80]. Ponadto w badaniach na drożdżach i bakteriach wykazano, że $O_2^{\cdot -}$ przyczynia się do zwiększenia stężenia jonów Fe w LIP. Prawdopodobnym mechanizmem jest uwalnianie przez $O_2^{\cdot -}$ jonów żelaza z klastrów [Fe-S], które są kofaktorami wielu enzymów biorących udział w różnych procesach metabolicznych komórek. Jednym z enzymów najbardziej czułych na oksydacyjną inaktywację przez $O_2^{\cdot -}$ jest akonitaza mitochondrialna (Aco2), enzym zawierający centrum aktywne [4Fe-4S], biorący udział w cyklu Krebsa, katalizujący reakcję przekształcania cytrynianu w izocytrynian [26]. W komórkach ssaków występuje ponadto akonitaza cytoplazmatyczna (Aco1) określana również jako IRP1 (*Iron Regulatory Protein 1*), które to białko w formie pozbawionej klastra [4Fe-4S], czyli w formie apo-IRP1 wiąże się z sekwencjami IRE (*Iron Responsive Element*) umiejscowionymi w niepodlegających translacji rejonach 5' i 3' (*untranslated regions*, UTR) transkryptów kodujących niektóre białka związane z wewnątrzkomórkowym metabolizmem żelaza [78]. Wiązanie się apo-IRP1 lub brak wiązania holo-IRP1 z sekwencjami IRE leży u podstawy regulacji w/w transkryptów. Bezpośrednia reakcja $O_2^{\cdot -}$ z klastrem holo-IRP1 prowadzi do usunięcia 1 atomu Fe, tzw. atomu Fe_a , kluczowego dla

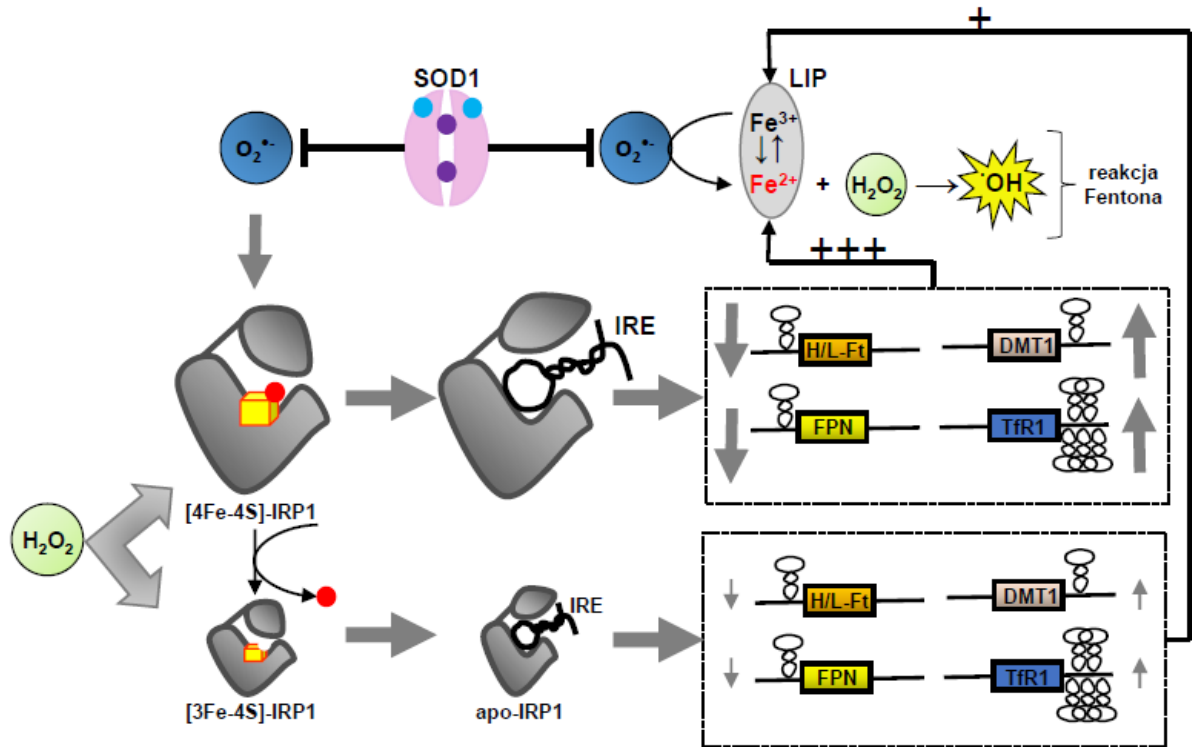
aktywności enzymatycznej holo-IRP1 [7], z klastra [4Fe-4S], w wyniku czego powstaje forma IRP1 zawierająca klaster [3Fe-4S], tzw. forma „null”, która nie posiada ani aktywności enzymatycznej, ani, podobnie do holo-IRP1, aktywności *trans*-regulatorowej [17]. Według niektórych badaczy obniżenie aktywności akonitazowej IRP1 prowadzi do akumulacji w cytoplazmie substratu tego enzymu czyli cytrynianu, które chroni klastry [4Fe-4S] w pozostałych jeszcze cząsteczkach holo-IRP1 przed całkowitą ich degradacją, co jest powiązane z indukcją formy apo-IRP1, przez reaktywne pochodne tlenu (np. H₂O₂- nadtlenek wodoru) i azotu (np. NO· - tlenek azotu, ONOO⁻ - nadtlenoazotyn). Zaproponowano, że może to być regulacja o charakterze sprzężenia zwrotnego, która łagodzi silny prooksydacyjny efekt reaktywnych form azotu [17]. Inny mechanizm buforujący chelatu cytrynian-Fe może polegać na ograniczeniu ekspresji przez ten kompleks syntazy tlenu azotu 2 (*nitric oxide synthase 2*, NOS2), enzymu indukowanego transkrypcyjnie przez cytokiny prozapalne [103].

Nieoczekiwanym efektem oddziaływania O₂^{•-} na IRP1 okazało się, obniżenie ekspresji genu *Irp1* w warunkach utraty aktywności SOD1 u myszy z unieczynnionym genem *Sod1* [93], u których stwierdzono drastycznie zwiększony poziom O₂^{•-} [29]. W niniejszej rozprawie podjęto wątek tej regulacji w odniesieniu do zmian aktywności SOD1 w warunkach fizjologicznych zachodzących w toku rozwoju ontogenetycznego myszy. W tym celu, po pierwsze, sprawdzono występowanie badanej zależności w wątrobie myszy w okresie pre- i postnatalnym. Stwierdzono, że wahania aktywności SOD1 w okresie od dnia E14,5 życia embrionalnego/płodowego do 70 dnia życia po urodzeniu są stosunkowo niewielkie i nie są skorelowane ze zmianami ekspresji IRP1 na poziomie białka. Ponadto wykazano, że opisana prawidłowość braku aktywności SOD1 i niskiej ekspresji genu *Irp1* nie występuje w okresie prenatalnym myszy, ponieważ poziom IRP1 u płodów *Sod1*^{-/-} i *Sod1*^{+/+} był bardzo zbliżony. Różnica w ekspresji genu *Irp1*, zaobserwowana wcześniej u myszy dorosłych [93], ujawnia się jednak bardzo szybko – już w pierwszym dniu po urodzeniu. Prawdopodobną przyczyną braku obniżenia poziomu białka IRP1 u płodów *Sod1*^{-/-} jest niskie ciśnienie parcjalne O₂ w obwodowej krwi płodowej (około 2,2 kPa) [89], a tym samym mniejszy potencjał generowania O₂^{•-}. Testując dalej zależność między aktywnością SOD1 a poziomem IRP1 stwierdzono, że u myszy z jednym czynnym allelem *Sod1* (*Sod1*^{+/-}), u których aktywność SOD1 jest o około 40% niższa w porównaniu do myszy *Sod1*^{+/+}, nie odnotowano spadku poziomu IRP1. Na podstawie uzyskanych wyników można wyciągnąć wniosek, że opisana regulacja występuje tylko w sytuacji braku lub skrajnego obniżenia aktywności SOD1, a tym samym proporcjonalnego zwiększenia poziomu O₂^{•-}, co może mieć miejsce w warunkach patologicznych związanych ze wzbudzeniem silnego stresu oksydacyjnego. W

związku z powyższym postanowiono sprawdzić, czy wywołanie zależnego od $O_2^{\cdot-}$ stresu oksydacyjnego w warunkach natywnej aktywności SOD1 wpływa na obniżenie ekspresji genu *Irp1*. Doświadczenia przeprowadzone na makrofagach mysich poddanych działaniu parakwatu (PQ, związku chemicznego cyklicznie generującego $O_2^{\cdot-}$ [12]) wykazały spadek ekspresji genu *Irp1* oraz obniżenie jego aktywności enzymatycznej i *trans*-regulatorowej. Tym samym, wyniki te są w pełni spójne z obserwacjami dokonanymi na myszach z nokautem genu *Sod1* [93]. Zmniejszenie aktywności *trans*-regulatorowej IRP1 nasuwa pytanie o ekspresję genów potranskrypcyjnie regulowanych przez IRP1. Analizowano więc ekspresję L-ferrytyny (L-Ft) i receptora transferryiny 1 (TfR1), których transkrypty zawierają sekwencje IRE odpowiednio w 5' UTR i 3'UTR. Lokalizacja sekwencji IRE w danym transkrypcie skutkuje tym, że przy braku wiązania IRP1 z IRE w 3'UTR (np. przy obniżonym poziomie IRP1, lub gdy w komórkach dominuje holo-IRP1 lub [3Fe-4S]-IRP1) mRNA TfR1 ulega degradacji, natomiast poziom mRNA L-Ft (IRE w 5'UTR) nie zmienia się, natomiast odblokowana jest jego translacja, co skutkuje wzrostem poziomu białka [78,94]. W makrofagach szpiku kostnego pozyskanych od myszy kontrolnych („dzikich”) nie wykazano zmian ekspresji mRNA TfR1 pod wpływem PQ. Wynik ten sugeruje, że obniżenie ekspresji IRP1 w tych komórkach nie wpływa na regulację TfR1. Niespodziewanie, w komórkach myszy traktowanych PQ stwierdzono podwyższoną ekspresję mRNA L-Ft, skorelowaną z podwyższonym poziomem białka. Co ciekawe, podobny wzrost ekspresji L-Ft odnotowano również w makrofagach izolowanych od myszy z nokautem genu *Irp1*. Pospołu, wyniki te dobitnie dowodzą, że obserwowana regulacja jest niezależna od IRP1. Prawdopodobnym wytłumaczeniem regulacji ekspresji L-Ft przez PQ zarówno w makrofagach *Irp1*^{+/+} jak i *Irp1*^{-/-} jest wzrost stężenia H_2O_2 , do którego dochodzi w trakcie spontanicznej dysmutacji $O_2^{\cdot-}$ [12]. H_2O_2 jest uznanym czynnikiem indukującym ekspresję genów *H-Ft* i *L-Ft* na poziomie transkrypcji [68]. Wydaje się więc, że w komórkach traktowanych PQ mamy do czynienia ze wzrostem ekspresji mRNA L-Ft (efekt H_2O_2) i obniżeniem ekspresji IRP1 (efekt $O_2^{\cdot-}$), co ostatecznie prowadzi do podwyższenia poziomu białka L-Ft. Takiego efektu nie obserwowano w przypadku TfR1, gdyż gen *TfR1* nie jest indukowany transkrypcyjnie w warunkach stresu oksydacyjnego.

W obliczu uzyskanych wyników pojawia się pytanie o biologiczny sens regulacji ekspresji i aktywności IRP1 przez parę czynników: reaktywną pochodną tlenu, $O_2^{\cdot-}$ i neutralizujący ją antyoksydacyjny enzym SOD1. Stosowną hipotezę przedstawiono na Rysunku 4. W trakcie stresu oksydacyjnego generowane są różne reaktywne pochodne O_2 , a wśród nich H_2O_2 i $O_2^{\cdot-}$. H_2O_2 , z jednej strony, indukuje transkrypcję genów *H-Ft* i *L-Ft* [97],

która to regulacja ma potencjalnie cytoprotekcyjny charakter ze względu na ograniczenie dostępności jonów żelaza do reakcji Fentona. Wydaje się jednak, że opisana przed 26 laty zależna od H_2O_2 regulacja potranskrypcyjna *via* IRP1 [71,55], czyli zwiększenie zdolności wiązania się IRP1 z sekwencjami IRE w transkryptach H- i L-Ft przez H_2O_2 jest regulacją nadrzędną. Może ona prowadzić w sposób zsynchronizowany nie tylko do zmniejszenia potencjału magazynowana żelaza przez Ft, ale również ograniczenia transportu żelaza z komórki przez ferroportynę (Fpn) i do zwiększenia transportu żelaza do komórki przez TfR1. Sumarycznie, regulacje te prowadzą do nadmiernego wzrostu poziomu LIP w komórkach (Lipiński i wsp., wyniki niepublikowane) i do zaostrzenia stresu oksydacyjnego. $O_2^{\cdot-}$ poprzez zdolność do obniżenia poziomu IRP1 zmniejsza skutki tej potranskrypcyjnej, zależnej od H_2O_2 regulacji, a co za tym idzie wpływa na osłabienie natężenia stresu oksydacyjnego. Regulację tę można uznać z element w szeregu poznanych już sygnalizacyjnych procesów redoks, zachodzących z udziałem $O_2^{\cdot-}$, które pełnią istotną rolę w utrzymaniu lub przywracaniu komórkowej homeostazy, procesów często określanymi mianem oksydacyjnego eustresu [88]. W tym kontekście aktywność enzymatyczna SOD1 odbiega od jej klasycznej, antyoksydacyjnej aktywności. Należy jednak pamiętać, że eliminacja $O_2^{\cdot-}$ przez SOD1 w środowisku wewnątrzkomórkowym ma kluczowe znaczenie w ograniczaniu puli jonów Fe^{2+} , biorących udział w katalizowaniu reakcji Fentona i generowaniu rodnika $\cdot OH$. Ta toksyczna funkcja $O_2^{\cdot-}$, jak również inaktywacja przez $O_2^{\cdot-}$ licznych enzymów biorących udział w komórkowym metabolizmie, znajdują utrwaloną w procesie ewolucji przeciwwagę w aktywności enzymatycznej SOD1.



Rysunek 4. SOD1 i anionorodnik ponadtlenny ($O_2^{\bullet-}$) w regulacji toksyczności żelaza w komórce. Cytoplazmatyczna labilna pula żelaza (LIP) jest głównym źródłem jonów tego metalu czynnych w generowaniu niezwykle reaktywnego, toksycznego rodnika $\cdot OH$ (reakcja Fentona). Poziom LIP w komórkach ssaków regulowany jest w przez system IRP(IRP1/IRP2)/IRE. W warunkach stresu oksydacyjnego równolegle generowane są różne pochodne tlenu cząsteczkowego (O_2), między innymi H_2O_2 i $O_2^{\bullet-}$, które oddziałują na ekspresję i aktywność głównie IRP1. H_2O_2 indukuje aktywność wiązania się IRP1 do sekwencji IRE występujących w 5' i 3' UTR transkryptów kodujących białka wewnątrzkomórkowego metabolizmu żelaza: podjednostek ferrytyny (H- i L-Ft), ferroportyny (Fpn) i receptora transfery 1 (TfR1). Sumarycznym efektem tej regulacji jest wzrost stężenia żelaza w LIP, a tym samym zaostrzenie stresu oksydacyjnego. $O_2^{\bullet-}$ osłabia częściowo ten efekt poprzez zmniejszenie poziomu IRP1 w komórce. Z kolei SOD1 (na ikonie tego enzymu na fioletowo zaznaczono atomy cynku, a na niebiesko atomy miedzi), jako enzym neutralizujący $O_2^{\bullet-}$ w cytoplazmie, ogranicza tę regulację. Ponieważ jednak $O_2^{\bullet-}$ jest głównym czynnikiem redukującym, w obrębie LIP, jony Fe^{3+} do jonów Fe^{2+} , które katalizują reakcję Fentona, enzymatyczna aktywność SOD1 jest istotnym elementem antyoksydacyjnego potencjału komórkowego. Ponadto chroni przed inaktywacją przez $O_2^{\bullet-}$ szereg enzymów metabolizmu komórkowego, w tym enzymów zawierających centra Fe-S, co pokazano na przykładzie holo-IRP1 *alias* cytoplazmatycznej akonitazy (usunięcie przez $O_2^{\bullet-}$ z centrum [4Fe-4S] atomu żelaza determinującego aktywność akonitazową).

Jak już wspomniano, produktem dwustopniowej reakcji enzymatycznej katalizowanej przez SOD1 jest H_2O_2 [106]. W cytoplazmie ta reaktywna pochodna O_2 jest efektywnie eliminowana przez współpracujące z SOD1 inne enzymy antyoksydacyjne: katalazę, peroksydazy i peroksyredoksyny [76]. Warto zaznaczyć jednak, że obecność SOD1 wykazano również w przestrzeni między wewnętrzną i zewnętrzną błoną (*intermembrane space*) mitochondriów [27] i w tej lokalizacji eliminacja H_2O_2 , produktu reakcji katalizowanej przez SOD1 jest o wiele mniej skuteczna [99]. Ta uwaga nabiera szczególnego znaczenia w kontekście badań na modelach zwierzęcych z nadekspresją genu *Sod1*. Są to głównie modele mysie i szczurze z nadekspresją zmutowanego ludzkiego genu *SOD1*, które stanowią uznany

model ciężkiej patologii występującej u ludzi, jaką jest stwardnienie zanikowe boczne (*Amyotrophic Lateral Sclerosis*, ALS) [73]. Mutacje genu *SOD1* są odpowiedzialne za około 20% przypadków rodzinnej formy ALS. Do tej pory zidentyfikowano około 150 mutacji w genie *SOD1* [73]. Są wśród nich mutacje, które wpływają na zahamowanie aktywności enzymatycznej *SOD1* (np. *SOD1*(H46R) [42]) ale są i takie, które nie naruszają aktywności *SOD1* (np. *SOD1*(G93A) i *SOD1*(G37R) [42]). Jednym z najbardziej dostępnych i najczęściej używanych w badaniach naukowych modeli zwierzęcych ALS są myszy z nadekspresją genu *SOD1*^{G93A} [53]. Myszy pochodzące z Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) posiadają w swym genomie wiele kopii zmutowanego genu *SOD1*^{G93A} [<https://www.jax.org/strain/002726>] i jak potwierdzono w niniejszej rozprawie charakteryzują się podwyższoną aktywnością *SOD1* w tkankach. Należy jednak pamiętać, że zwiększona aktywność *SOD1* odnotowana w tkankach myszy z nadekspresją genów *SOD1*^{G93A} i *SOD1*^{G37R} nie występuje u ludzi cierpiących na ALS, a tym samym u myszy transgenicznych mamy do czynienia z dodatkowym źródłem stresu oksydacyjnego. Wybór myszy *SOD1*^{G93A} jako zwierząt doświadczalnych na potrzeby niniejszej rozprawy podyktowany był tym, że model ten pozwala na analizę regulacji metabolizmu żelaza w warunkach zwiększonej aktywności *SOD1* (a więc w warunkach całkowicie odmiennych od myszy z nokautem genu *Sod1*, których użyto w pierwszej części rozprawy), a jednocześnie na identyfikację zaburzeń metabolizmu żelaza w ALS. Aby to rozróżnienie było możliwe do układu doświadczalnego wprowadzono myszy z nadekspresją normalnego ludzkiego genu *SOD1*, jako swoistej grupy kontrolnej. Jest to zabieg, który według mojej najlepszej wiedzy jest sporadycznie stosowany w badaniach naukowych, w których wykorzystuje się transgeniczne myszy z nadekspresją zmutowanego genu *SOD1*, nieskutkującego utratą aktywności enzymu. Z uwagi na progresywny charakter ALS istotnym elementem metodycznym było użycie zwierząt asymptomatycznych (w wieku 2 miesięcy) i symptomatycznych (w wieku 4 miesięcy), co pozwalało na rejestrowanie zmian metabolizmu żelaza zachodzące w trakcie rozwoju patologii. ALS jest stanem chorobowym związanym z selektywną degeneracją, dysfunkcją i zanikiem neuronów w korze ruchowej i rdzeniu kręgowym, czego konsekwencją jest atrofia mięśni szkieletowych [70]. Niektórzy Autorzy uważają jednak, że atrofia ta jest bezpośrednim efektem degeneracji komórek mięśniowych [16]. W doświadczeniach analizowano więc metabolizm żelaza w rdzeniu przedłużonym, rdzeniu kręgowym oraz w mięśniach szkieletowych: najszerszym grzbiecie i brzuchatym łydki. Postanowiono jednak również poddać analizie wątrobę i nerki jako organy o kluczowym znaczeniu w ogólnoustrojowej homeostazie żelaza, które nie podlegają degeneracji w ALS. Szczegółową dyskusję

uzyskanych wyników przeprowadzono w publikacji nr. 2. W niniejszej syntezie przedyskutowane będą najważniejsze wyniki.

Jednym z ciekawszych uzyskanych wyników jest wzrost ekspresji podjednostki ciężkiej ferrytyny (H-Ft) we wszystkich badanych tkankach, obserwowany zarówno u 2- jak i 4-miesięcznych myszy z nadekspresją *SOD1^{G93A}* i *SOD1*. Wyniki te wskazują, że wzrost poziomu białka H-Ft jest niezależny od wieku myszy i nie jest specyficzny dla ALS. Prawdopodobną przyczyną indukcji H-Ft w tkankach myszy transgenicznym, w porównaniu do myszy kontrolnych, jest podwyższone stężenie H₂O₂ spowodowane zwiększoną aktywnością SOD1. H₂O₂ jest uznanym czynnikiem indukującym transkrypcję genu *H-Ft* poprzez zidentyfikowane czynniki transkrypcyjne, wiążące się z określonymi sekwencjami w promotorze genu *H-Ft* [97]. Regulacja ta uważana jest za element łagodzący przebieg stresu oksydacyjnego poprzez ograniczenie dostępności jonów Fe²⁺ do reakcji Fentona. Ze względu na ograniczoną ilość materiału biologicznego, nie przeprowadzono badania aktywności *trans-regulatorowej* IRP1 w tkankach myszy. Jak już wspomniano przy omawianiu wyników zawartych w publikacji nr. 1, zależna od IRP1 regulacja przez H₂O₂ jest regulacją prowadzącą do zahamowania translacji mRNA H-Ft, co w efekcie końcowym (poziom białka) może przeważać nad transkrypcyjną indukcją genu *H-Ft* przez H₂O₂. Najwyraźniej jednak w warunkach zwiększonej aktywności SOD1 w tkankach myszy *SOD1^{G93A}* i *SOD1* i domniemanego zwiększonego stężenia H₂O₂, IRP1 nie jest aktywowane. Potwierdza to nie tylko wzrost H-Ft ale również brak obniżenia poziomu białka L-Ft i Fpn, których transkrypty zawierają sekwencje IRE w 5'UTR.

Zaburzenia metabolizmu żelaza występujące w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, a polegające na nadmiernej akumulacji tego mikroelementu towarzyszą chorobom neurodegeneracyjnym u ludzi i są szeroko udokumentowane w piśmiennictwie naukowym [69,34]. Depozyty żelaza wykryto również w mózgu i rdzeniu kręgowym pacjentów z ALS [44,39] oraz myszy eksprymujących zmutowany ludzki gen *SOD1* [42,50]. Prawdopodobnie najbardziej przekonującym dowodem na udział żelaza i stresu oksydacyjnego w patogenezie ALS jest terapeutyczny efekt zastosowania chelatorów żelaza [42,49,50]. W badaniach objętych rozprawą nie oszacowano zawartości żelaza w rdzeniu przedłużonym i kręgowym (również, ze względu na zbyt małą ilość materiału biologicznego), natomiast stwierdzono występowanie depozytów żelaza w mięśniach brzuchatym myszy symptomatycznych *SOD1^{G93A}* i była to pierwsza istotna zmiana metabolizmu żelaza charakterystyczna *stricte* dla ALS, a tym samym prawdopodobnie niezależna od zwiększonej aktywności SOD1. Ponadto obserwowano patologiczne zmiany w architekturze mięśnia. Wyniki te wskazują jednak

wyraźnie, że poza układem nerwowym również w mięśniach szkieletowych dochodzi do zaburzenia metabolizmu żelaza w ALS. Nie rozstrzygają jednak, czy mięśnie szkieletowe stanowią, jak sugerują to Dobrowolny i wsp. [16], preferencyjną tkankę objętą zmianami patologicznymi w ALS.

Prawdopodobnie najciekawszym wynikiem tej części badań jest wszechstronne (metodycznie) udokumentowanie indukcji genu *Hmox1* (na poziomie mRNA - analiza Real Time-PCR i białka - analizy: Western blot i immunofluorescencja, IF), która zachodzi specyficznie w tkankach dotkniętych patologią i tylko u myszy symptomatycznych *SOD1^{G93A}*. Oznacza to, że zwiększona aktywność SOD1 nie wpływa na indukcję genu *Hmox1*. Immunolokalizacja HO1 (oksygenazy hemowej 1) w rdzeniu kręgowym symptomatycznych myszy *SOD1^{G93A}* i myszy kontrolnych nie tylko potwierdza wyniki uzyskane przy pomocy techniki Western Blot, ale, co niezwykle istotne, umiejscawia ekspresję tego białka w komórkach mikrogleju, komórkach nieneuronalnych centralnego układu nerwowego, które są rezydentnymi makrofagami, biorącymi udział w reakcji zapalnej [105]. Stwierdzono to na podstawie kolokalizacji sygnału HO1 z sygnałem generowanym przez białko Iba1 (*ionized calcium binding adaptor molecule 1*), specyficzny marker mikrogleju w układzie nerwowym [40]. Zwiększona ekspresja HO1 w rdzeniu kręgowym symptomatycznych myszy *SOD1^{G93A}* była już przedmiotem doniesień innych autorów [32,21,60], chociaż niektóre badania wskazują na brak indukcji HO1 w tym modelu [19]. Nowatorski charakter wyników dotyczących HO1, uzyskanych w niniejszej rozprawie, polega na wykazaniu, że transkrypcyjna indukcja genu *Hmox1* u myszy z mutacją SOD1(G93A) jest integralnym elementem patologii (a nie zwiększonej aktywności SOD1), oraz że specyficznie zachodzi w komórkach mikrogleju. Wcześniejsze próby immunolokalizacji HO1 wykazały obecność tego enzymu ogólnie w komórkach gleju [21] oraz w astrocytach [32]. HO1 jest enzymem o szeroko udokumentowanym działaniu cytoprotekcyjnym, antyoksydacyjnym i przeciwzapalnym [79]. Ponadto pełni funkcje w procesie angiogenezy, bierze udział w kontroli cyklu komórkowego oraz reguluje różnicowanie się komórek macierzystych i progenitorowych [47]. W odniesieniu do metabolizmu żelaza jej cytoprotekcyjny/antyoksydacyjny charakter polega na wyeliminowaniu wolnego hemu, cząsteczki o potencjalnym toksycznym działaniu, co w powiązaniu z równoległym zwiększeniem ekspresji H-Ft zapewnia ograniczenie toksyczności zależnej od żelaza jonowego (Fe^{2+}), uwalnianego w toku reakcji katalizowanej przez HO1 [28]. Rzeczywiście, w rdzeniu kręgowym myszy z nadekspresją genu stwierdzono podwyższony poziom H-Ft, chociaż nie określono ostatecznie komórkowej lokalizacji tego fenomenu oraz jego

specyficzności w ALS. Silna selektywna indukcja HO1 w komórkach mikrogleju, jak również ekspansja tych komórek w rdzeniu kręgowym myszy z nadekspresją genu *SOD1^{G93A}* sugeruje aktywację mikrogleju jako element odpowiedzi przeciwzapalnej występującej w przebiegu ALS [58,66].

Podsumowując, uzyskane wyniki stanowią 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 IRP1, jednego z dwóch białek regulujących komórkowy metabolizm żelaza. Niewątpliwie, dla uzyskania pełnego obrazu interakcji niezbędne jest zbadanie ekspresji, a tym samym, aktywności *trans*-regulatorowej IRP2. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że w warunkach stresu oksydacyjnego, w którym operują różne reaktywne pochodne O_2 (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$), aktywność enzymatyczna SOD1 może mieć nie tylko antyoksydacyjne ale również prooksydacyjne oddziaływanie (Rysunek 4). Badania przeprowadzone na transgenicznym myszom z nadekspresją genów *SOD1^{G93A}* (zwierzęcy model ALS) i *SOD1*, charakteryzujących podwyższoną aktywnością SOD1 dowodzą, że nieznanym dotychczas elementem antyoksydacyjnego efektu SOD1 (gdzie aktywność enzymu jest podwyższona) jest wzrost poziomu ferrytyny, jako białka ograniczającego pulę toksycznego żelaza. Dodatkowo, wyniki uzyskane w rozprawie jednoznacznie wskazują na to że, badanie metabolizmu żelaza oparte na mysim modelu ALS z nadekspresją zmutowanego ludzkiego genu *SOD1^{G93A}*, która to mutacja nie wpływa na aktywność enzymu, bezwarunkowo wymaga jednoczesnego użycia myszy z nadekspresją normalnego genu *SOD1*. Jest to konieczne dla wiarygodnej identyfikacji zmian metabolizmu żelaza zachodzących specyficznie w tkankach myszy ALS.

Na koniec, odnotowany wzrost ekspresji genu *Hmox1* w proliferujących komórkach mikrogleju rdzenia kręgowego myszy *SOD1^{G93A}* otwiera pole do interesujących badań nad rolą HO1 w patologii ALS.

7. Wnioski

1. Jedynie brak aktywności SOD1 i silny, zależny od $O_2^{\cdot-}$ stres oksydacyjny powodują obniżenie ekspresji IRP1 oraz aktywności akonitazowej i *trans*-regulatorowej tego białka, co może wpływać na zmiany w metabolizmie żelaza.
2. Zależność pomiędzy niską aktywnością SOD1 i obniżonym poziomem IRP1 wątrobie nie występuje w okresie płodowym myszy, co sugeruje, że zanika pod wpływem zmniejszonej ekspozycji na O_2 .

3. Podwyższona aktywność SOD1 u myszy transgenicznych z nadekspresją ludzkiego genu *SOD1* wpływa na wzrost ekspresji podjednostek ferrytyny, co może być elementem odpowiedzi antyoksydacyjnej na zwiększenie stężenia H₂O₂.
4. Identyfikacja zmian w ekspresji genów metabolizmu żelaza występujących specyficznym w mysim modelu ALS z nadekspresją zmutowanego ludzkiego genu *SOD1*^{G93A}, wymaga przeprowadzenia równoległej analizy na myszach z nadekspresją niezmutowanego, normalnego genu *SOD1*.
5. Gen *Hmox1*, kodujący oksygenazę hemową 1, jest specyficznym indukowany w komórkach mikrogleju rdzenia kręgowego myszy symptomatycznych *SOD1*^{G93A}, wskazuje na występowanie reakcji zapalnej w przebiegu ALS.

8. Piśmiennictwo

1. Ajioka RS, Phillips JD, Kushner JP. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(7):723-36.
2. Andrews NC. The iron transporter DMT1. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31:991-994.
3. Austyn JM, Gordon S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*. 1981;11(10):805-815.
4. Bartosz G. Druga twarz tlenu. PWN, 2008.
5. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem*. 1971;44:276-287.
6. Bouton C, Chauveau MJ, Lazereg S, Drapier JC. Recycling of RNA binding iron regulatory protein 1 into an aconitase after nitric oxide removal depends on mitochondrial ATP. *J Biol Chem*. 2002;277(34):31220-7.
7. Brown NM, Kennedy MC, Antholine WE, Eisenstein RS, Walden WE. Detection of a [3Fe-4S] cluster intermediate of cytosolic aconitase in yeast expressing iron regulatory protein 1. Insights into the mechanism of Fe-S cluster cycling. *J Biol Chem*. 2002;277(9):7246-54.
8. Bu X-L, Xiang Y, Guo Y. The Role of iron in amyotrophic lateral sclerosis W: Brain iron metabolism and CNS diseases (Advances in Experimental Medicine and Biology) Yan-Zhong Chang (Red.) Springer 2019;1173:145-153.
9. Casey JL, Koeller DM, Ramin VC, Klausner RD, Harford JB. Iron regulation of transferrin receptor mRNA levels requires iron-responsive elements and a rapid turnover determinant in the 3' untranslated region of the mRNA. *EMBO J*. 1989;8(12):3693-9.
10. Chen L, Na R, Danae McLane K, Thompson CS, Gao J, Wang X, Ran Q. Overexpression of ferroptosis defense enzyme Gpx4 retards motor neuron disease of SOD1G93A mice. *Sci Rep*. 2021;11(1):12890.
11. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*. 2006;1(2):581-5.
12. Cochemé HM, Murphy MP Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J Biol Chem*. 2008;283(4):1786-98.
13. Dailey HA, Dailey TA, Wu CK, Medlock AE, Wang KF, Rose JP, Wang BC. Ferrochelatase at the millennium: structures, mechanisms and [2Fe-2S] clusters. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57(13-14):1909-26.
14. De Freitas JM, Liba A, Meneghini R, Valentine JS, Gralla EB. Yeast lacking Cu-Zn superoxide dismutase show altered iron homeostasis. Role of oxidative stress in iron metabolism. *J Biol Chem*. 2000;275, 11645-11649.

15. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B 3rd, Stockwell BR. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012;149(5):1060-72.
16. Dobrowolny G, Aucello M, Rizzuto E, Beccafico S, Mammucari C, Boncompagni S, Belia S, Wannenes F, Nicoletti C, Del Prete Z, Rosenthal N, Molinaro M, Protasi F, Fanò G, Sandri M, Musarò A. Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab*. 2008;8(5):425-36.
17. Drapier JC, Bouton C. Modulation by nitric oxide of metalloprotein regulatory activities. *Bioessays*. 1996;18(7):549-56.
18. Drapier JC, Hibbs JB. Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis. *Methods Enzymol*. 1996;269:26-36.
19. Dwyer BE, Lu SY, Nishimura RN. Heme oxygenase in the experimental ALS mouse. *Exp Neurol*. 1998;150(2):206-12.
20. Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson Roberts L, Van Remmen H, Epstein CJ, Huang TT. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 2005;24:367–380.
21. Feng X, Peng Y, Liu M, Cui L. DL-3-n-butylphthalide extends survival by attenuating glial activation in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology*. 2012;62(2):1004-10.
22. Fenton HJH. The oxidation of tartaric amid in presence of iron. *J Chem Soc*. 1894;65:899-910.
23. Fukushima T, Tanaka K, Lim H, Moriyama M. Mechanism of cytotoxicity of paraquat. *Environ Health Prev Med*. 2002;7(3):89:94.
24. Galy B, Ferring D, Minana B, Bell O, Janser HG, Muckenthaler M, Schümann K, Hentze MW. Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2). *Blood*. 2005;106(7):2580-9.
25. Ganz T. Cellular iron: ferroportin is the only way out. *Cell Metab*. 2005;1:155-157.
26. Gardner PR, Raineri I, Epstein LB, White CW. Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J Biol Chem*. 1995;270(22):13399-405.
27. Goldsteins G, Keksa-Goldsteine V, Ahtoniemi T, Jaronen M, Arens E, Akerman K, Chan PH, Koistinaho J. Deleterious role of superoxide dismutase in the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem*. 2008;283(13):8446-52.
28. Gozzelino R, Soares MP. Coupling heme and iron metabolism via ferritin H chain. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(11):1754-69.
29. Grzelak A, Kruszewski M, Macierzyńska E, Piotrowski Ł, Pułaski Ł, Rychlik B, Bartosz G. The effects of superoxide dismutase knockout on the oxidative stress parameters and survival of mouse erythrocytes. *Cell Mol Biol Lett*. 2009;14(1):23-34.
30. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, DalCanto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon JW, Deng H-X, Chen W, Zhai P, Sufit RL, Siddique T. Motor neuron degeneration in mice that express human Cu,Zn-superoxide dismutase mutation. *Science* 1994;264,1772–1775.
31. Guo B, Yu Y, Leibold EA. Iron regulates cytoplasmic levels of a novel iron-responsive element-binding protein without aconitase activity. *J Biol Chem*. 1994;269: 24252-24260.
32. Guo Y, Duan W, Li Z, Huang J, Yin Y, Zhang K, Wang Q, Zhang Z, Li C. Decreased GLT-1 and increased SOD1 and HO-1 expression in astrocytes contribute to lumbar spinal cord vulnerability of SOD1-G93A transgenic mice. *FEBS Lett*. 2010;584(8):1615-22.
33. Guo Y, Zhang K, Wang Q, Li Z, Yin Y, Xu Q, Duan W, Li C. Neuroprotective effects of diallyl trisulfide in SOD1-G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res*. 2011;1374:110-5.

34. Hadzhieva M, Kirches E, Mawrin C. Review: iron metabolism and the role of iron in neurodegenerative disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014;40:240–257.
35. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1996;1275:161-203.
36. Hassan HM. Exacerbation of superoxide radical formation by paraquat. *Methods Enzymol*. 1984;105:523-532.
37. Healy EF, Roth-Rodriguez A, Toledo S.A model for gain of function in superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res*. 2020;21:100728.
38. Hentze MW, Rouault TA, Harford JB, Klausner RD. Oxidation-reduction and the molecular mechanism of a regulatory RNA-protein interaction. *Science*. 1989;244(4902):357-9.
39. Ignjatović, A, Stević, Z, Lavrnić S, Daković M, Bačić G. Brain iron MRI: a biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *J Magn Reson Imaging*. 2013;38:1472–1479.
40. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998;57:1-9.
41. Iuchi Y, Okada F, Onuma K, Onoda T, Asao H, Kobayashi M, Fuji J. Elevated oxidative stress in erythrocytes due to an SOD1 deficiency causes and triggers autoantibody production. *Biochem J*. 2007;402:219-227.
42. Jeong SY, Rathore KI, Schulz K, Ponka P, Arosio P, David S. Dysregulation of iron homeostasis in the CNS contributes to disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci*. 2009;29:610-619.
43. Kakhlon O, Cabantchik ZI. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:1037-1046.
44. Kasarskis EJ, Tandon L, Lovell MA, Ehmann WD. Aluminum, calcium, and iron in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis using laser microprobe mass spectroscopy: a preliminary study. *J Neurol Sci*. 1995;130:203–208.
45. Keithley EM, Canto, C, Zheng QY, Wang X, Fischel-Ghodsian N, Johnson KR. Cu/Zn superoxide dismutase and age-related hearing loss. *Hear Res*. 2005;209:76–85.
46. Kikuchi G., Yoshida T., Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338:558-567.
47. Kozakowska M, Dulak J, Józkwicz A. Heme oxygenase-1 - more than the cytoprotection. *Postepy Biochem*. 2015;61(2):147-58.
48. Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res*. 2003;531:81-92.
49. Kupersmidt L, Weinreb O, Amit T, Mandel S, Carri MT, Youdim MB. Neuroprotective and neuritogenic activities of novel multimodal iron-chelating drugs in motor-neuron-like NSC-34 cells and transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J*. 2009;23:3766-3779.
50. Lee JK, Shin JH, Gwag BJ, Choi EJ. Iron accumulation promotes TACE-mediated TNF- α secretion and neurodegeneration in a mouse model of ALS. *Neurobiol Dis*. 2015;80:63
51. Leibold EA, Munro HN. Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85(7):2171-5.
52. Lipiński P, Starzyński RR, Styś A, Gajowiak A, Staroń R. Heme metabolism as an integral part of iron homeostasis. *Postepy Hig Med Dosw*. 2014;68:557-70.
53. Liguori F, Amadio S, Volonté C. Where and why modeling amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8):3977.
54. Maines MD. Overview of heme degradation pathway. *Curr Protoc Toxicol*. 2001;Chapter 9:Unit 9.1.

55. Martins EA, Robalinho RL, Meneghini R. Oxidative stress induces activation of a cytosolic protein responsible for control of iron uptake. *Arch Biochem Biophys*. 1995;316(1):128-34.
56. Matzuk MM, Dionne L, Guo Q, Kumar TR, Lebowitz RM. Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. *Endocrinology*. 1998;139:4008-4011.
57. Meyron-Holtz EG, Ghosh MC, Iwai K, LaVaute T, Brazzolotto X, Berger UV, Land W, Ollivierre-Wilson H, Grinberg A, Love P, Rouault TA. Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO J*. 2004;23:386-39.
58. McCauley ME, Baloh RH. Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathol*. 2019;137(5):715-730.
59. McCord JM, Day ED. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett*. 1978;86:139-142.
60. Mimoto T, Morimoto N, Miyazaki K, Kurata T, Sato K, Ikeda Y, Abe K. Expression of heat shock transcription factor 1 and its downstream target protein T-cell death associated gene 51 in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res*. 2012;1488:123-31.
61. Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, Galy B.A. Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell*. 2017;168(3):344-361.
62. Mueller S. Iron regulatory protein 1 as a sensor of reactive oxygen species. *Biofactors*. 2005;24:171-181.
63. Muller FL, Song, W, Liu Y, Chaudhuri, A, Pieke-Dahl S, Strong, R, Huang TT, Epstein CJ, Roberts^{2nd} LJ, Csete M, Faulkner JA, Van Remmen H. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:1993-2004.
64. Musci G, Polticelli F, Bonaccorsi di Patti MC. Ceruloplasmin-ferroportin system of iron traffic in vertebrates. *World J Biol Chem*. 2014;5(2):204-15.
65. Müllner EW, Neupert B, Kühn LC. A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA. *Cell*. 1989;58(2):373-82.
66. Neusch C, Bähr M, Schneider-Gold C. Glia cells in amyotrophic lateral sclerosis: new clues to understanding an old disease? *Muscle Nerve*. 2007;35(6):712-24.
67. O'Brien L, Hosick PA, John K, Stec DE, Hinds TD Jr. Biliverdin reductase isozymes in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(4):212-20.
68. Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV, Torti FM. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J*. 2001;357(Pt 1):241-7.
69. Oshiro S, Morioka MS, Kikuchi M. (2011). Dysregulation of iron metabolism in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Pharmacol Sci*. 2011:378278.
70. Pansarasa O, Rossi D, Berardinelli A, Cereda C. Amyotrophic lateral sclerosis and skeletal muscle: an update. *Mol Neurobiol*. 2014;49(2):984-90.
71. Pantopoulos K, Hentze MW. Rapid responses to oxidative stress mediated by iron regulatory protein. *EMBO J*. 1995;14(12):2917-24.
72. Petrat F, de Groot H, Rauen U. Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem. J*. 2001;356:61-69.
73. Philips T, Rothstein JD. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015;69:5.67.1-5.67.21.
74. Ponka P, Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31(10):1111-37.
75. Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*. 1978;15(1):261-7.

76. Rhee SG, Yang KS, Kang SW, Woo HA, Chang TS. Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7:619–626.
77. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362:59-62.
78. Rouault TA. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol*. 2006;2:406-414.
79. Rytter SW. Heme Oxygenase-1, a cardinal modulator of regulated cell death and inflammation. *Cells*. 2021;10(3):515.
80. Sadowska-Bartosz I, Galiniak S, Bartosz G. Reakcja Fentona. *Kosmos*. 2014;63(3):309-314.
81. Salahudeen AA, Thompson JW, Ruiz JC, Ma HW, Kinch LN, Li Q, Grishin NV, Bruick RK. An E3 ligase possessing an iron-responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis. *Science*. 2009;326:722-726.
82. Salin ML, Bridges SM. Absence of the iron-containing superoxide dismutase in mitochondria from mustard (*Brassica campestris*). *Biochem. J*. 1981;195:229-233.
83. Santana-Codina N, Mancias JD. The Role of NCOA4 mediated ferritinophagy in health and disease. *Pharmaceuticals* (Basel). 2018;11(4):114.
84. Schad M, Konhauser KO, Sánchez-Baracaldo P, Kappler A, Bryce C. How did the evolution of oxygenic photosynthesis influence the temporal and spatial development of the microbial iron cycle on ancient Earth? *Free Radic Biol Med*. 2019;140:154-166.
85. Sentman ML, Granström M, Jakobson H, Reaume A, Basu S, Marklund SL. Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 2006;281:6904-6909.
86. Severance S, Hamza I. Trafficking of heme and porphyrins in metazoa. *Chem Rev*. 2009;109(10):4596-616.
87. Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL, Philpott CC. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science*. 2008;320(5880):1207-10.
88. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as a pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(7):363-383.
89. Siggaard-Andersen O, Huch R. The oxygen status of fetal blood. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*. 1995;107:129-35.
90. Srinivasan C, Liba A, Imlay JA, Valentine JS, Gralla EB. Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. *J Biol Chem*. 2000;275, 29187–29192.
91. Starzyński RR, Canonne-Hergaux F, Willemetz A, Gralak MA, Woliński J, Styś A, Olszak J, Lipiński P. Haemolytic anaemia and alterations in hepatic iron metabolism in aged mice lacking Cu,Zn-superoxide dismutase. *Biochem J*. 2009;420:383–390.
92. Starzyński RR, Lipiński P. IRP1, białko kontrolujące homeostazę żelaza w komórkach ssaków: regulacja jego aktywności przez jony żelaza i tlenek azotu. *Postępy Biol Kom*. 2003;30:497-514.
93. Starzyński RR, Lipiński P, Drapier J-C, Diet A, Smuda E, Bartłomiejezyk T, Gralak MA, Kruszewski M. Down-regulation of iron regulatory protein 1 activities and expression in superoxide dismutase 1 knock-out mice is not associated with alterations in iron metabolism. *J Biol Chem* 2005;280,4207–4212.
94. Styś A, Starzyński R, Lipiński P. The role of iron regulatory proteins in the control of iron metabolism in mammals. *BioTechnologia* 2011;92(1):66-75.
95. Styś A, Galy B, Starzyński RR, Smuda E, Drapier JC, Lipiński P, Bouton C. Iron regulatory protein 1 outcompetes iron regulatory protein 2 in regulating cellular iron homeostasis in response to nitric oxide. *J Biol Chem*. 2011;286:22846-22854.

96. Suzuki N, Nishiyama A, Kato M, Warita H, Aoki M. Familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Nerve*. 2019;71(11):1169-1181.
 97. Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*. 2002;99(10):3505-16.
 98. Vashisht AA, Zumbrennen KB, Huang X, Powers DN, Durazo A, Sun D, Bhaskaran N, Persson A, Uhlen M, Sangfelt O, Spruck C, Leibold EA, Wohlschlegel JA. Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase. *Science*. 2009;326:718-721.
 99. Vehviläinen P, Koistinaho J, Gundars G. Mechanisms of mutant SOD1 induced mitochondrial toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:126.
 100. Volz K. The functional duality of iron regulatory protein 1. *Curr Opin Struct Biol.*, 2008;18:106-111.
 101. Wang Q, Zhang X, Chen S, Zhang X, Zhang S, Youdium M, et al. Prevention of motor neuron degeneration by novel iron chelators in SOD1(G93A) transgenic mice of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis*. 2011;8:310-321.
 102. Wang T, Tomas D, Perera ND, Cuic B, Luikinga S, Viden A, Barton SK, McLean CA, Samson AL, Southon A, Bush AI, Murphy JM, Turner BJ. Ferroptosis mediates selective motor neuron death in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ*. 2021 Dec 2. doi: 10.1038/s41418-021-00910-z.
 103. Weiss G, Werner-Felmayer G, Werner ER, Grünewald K, Wachter H, Hentze MW. Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *J Exp Med*. 1994;180(3):969-76.
 104. Wright GSA. Molecular and pharmacological chaperones for SOD1. *Biochem Soc Trans*. 2020;48(4):1795-1806.
 105. Woodburn SC, Bollinger JL, Wohleb ES. The semantics of microglia activation: neuroinflammation, homeostasis, and stress. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):258.
 106. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD(SOD1), Mn-SOD(SOD2), and EC-SOD(SOD3) genes structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:337-349.
 107. Zheng J, Conrad M. The metabolic underpinnings of ferroptosis. *Cell Metab*. 2020;32(6):920-937.
- Plos

