

## **Recenzja rozprawy doktorskiej Pana Terence Al L. Abaquita pt. „The role of heme oxygenase in the nervous system of *Drosophila melanogaster*”**

Oksygenaza hemowa (EC 1.14.99.3) jest ważnym elementem obrony antyoksydacyjnej, często wykorzystywanym w badaniach jako marker aktywacji czynnika transkrypcyjnego Nrf2. Mimo licznych badań (prawie 20 000 publikacji w bazie Pubmed) jej biologiczne role nie są jednak w pełni poznane; w szczególności to stwierdzenie dotyczy układu nerwowego. Badania układu nerwowego nie są proste, więc dużo informacji o jego funkcjonowaniu czerpiemy z badań organizmów modelowych. Jednym z takich organizmów jest muszka owocowa (wywilżna karłowata) *Drosophila melanogaster*, która posłużyła Doktorantowi jako obiekt badań ukierunkowanych na zdobycie nowych informacji o roli tego enzymu w ośrodkowym układzie nerwowym.

Jako cel badań wykonywanych pod promotorską opieką Prof. dr hab. Elżbiety Pyzy, uznanego autorytetu w zakresie regulacji procesów okołodobowych w mózgu i mechanizmów regulacji procesów fizjologicznych przez zegar okołodobowy, Doktorant postawił sobie określenie wzoru ekspresji genu kodującego oksygenazę hemową w mózgu wywilżny w różnych warunkach oraz określenie roli oksygenazy hemowej obecnej w neuronach i w komórkach gleju w procesach życiowych *D. melanogaster*. W moim przekonaniu sformułowania zarówno celu pracy, jak i jej tytułu są nieco zbyt ogólne. Tytuł rozprawy byłby bardziej odpowiedni dla podsumowującej wiele badań pracy przeglądowej; muszę jednak przyznać, że trudno byłoby mi sprezytować w miarę zgrabny tytuł ściśle oddający treść rozprawy, a tak sformułowane cele i tytuł obejmują zakres przeprowadzonych badań i wyciągnięte z nich wnioski.

Podstawą rozprawy doktorskiej są dwie solidne publikacje, jakie ukazały się w dobrych międzynarodowych czasopismach naukowych „*Antioxidants*” i „*Frontiers in Physiology*”. Doktorant jest pierwszym autorem obu publikacji, a Jego rolę w ich powstaniu dokumentują oświadczenia wszystkich współautorów. Wprawdzie określanie procentowego wkładu współautorów w powstanie prac uważam za patologiczny wymysł polskiej biurokracji naukowej (pisałem o tym kiedyś na łamach *PAUzy Akademickiej*), jednak załączone oświadczenia autorów nie pozostawiają wątpliwości co do decydującego wkładu Doktoranta w pozyskanie danych, sformułowanie koncepcji prac i przygotowanie manuskryptów, a zatem prawa do przedstawienia ich jako podstawy rozprawy doktorskiej. Ponadto, w skład rozprawy wchodzi klarowne, obszernie, 48-stronicowe omówienie, napisane, tak jak publikacje, w języku angielskim.

Doktorant znakomicie wykorzystał możliwości stosowanego modelu badawczego. M. in., wykorzystując zestaw szczepów *Drosophila* zaopatrzonych w różne promotory uzyskał owady przejawiające nadekspresję lub wyciszenie genu *ho* w neuronach, w komórkach gleju i głównie w siatkówce. W mózgu wyizolowanych z głów owadów oznaczał poziom ekspresji genów *ho*, *rpl32*, *hid*, *atg5* i *atg10*, metodą luminescencyjną oznaczał aktywność kaspazy Drone w homogenatach głów owadów, oznaczał degenerację neuronów dopaminergicznych metodą immunochemiczną, badał morfologię

złożonych oczu owadów techniką skaningowej mikroskopii elektronowej i degenerację fotoreceptorów techniką histologiczną.

Badania Doktoranta przyniosły wiele interesujących wyników; chcę wspomnieć jedynie niektóre z nich.

Ciekawe było wykazanie okołodobowych wahań poziomu mRNA kodującego oksygenazę hemową, z dwoma minimami na początku dnia i nocy, utraty okołodobowej rytmiczności u starszych muszek, zachowania tej rytmiczności u muszek suplementowanych kurkuminą oraz zwiększenia ekspresji genu *ho* i zaburzenia jej rytmiczności w wyniku ekspozycji na parakwat. Te wyniki są tym bardziej interesujące, że o ile istnieją zasadnicze różnice w mechanizmach starzenia się owadów i ssaków, istnieje jednak duże podobieństwo starzenia się mózgu. Ciekawy jest w tym kontekście m. in. spadek amplitudy okołodobowych oscylacji w poziomie transkryptu genu *ho* w mózgu *Drosophila* u starszych (20-dniowych muszek), gdyż analogiczne zjawisko jest charakterystyczne dla starzenia się człowieka.

Doktorant stwierdził, że nadekspresja *ho* w neuronach zmniejszała przeżywalność muszek i ich aktywność wspinania, przy czym ten ostatni efekt był widoczny w wieku 14 dni lecz nie w wieku 7 dni. Wykazał też, że kurkumina nie wpływała na przeżywalność muszek i obniżała ich aktywność wspinania w temperaturze 25 °C, natomiast zwiększała przeżywalność *Drosophila* i aktywność wspinania w podwyższonej temperaturze (29 °C), co świadczy, że kurkumina przeciwdziałała stresowi oksydacyjnemu wywołanemu przez podwyższoną temperaturę. Ta pozornie niewielka różnica temperatury powodowała także odmienne efekty działania kurkuminy na poziom ekspresji genu *ho*, zwiększając ekspresję genu w temperaturze 25 °C a zmniejszając ją w temperaturze 29 °C.

Wyniki uzyskane przez Doktoranta wskazują, że oksygenaza hemowa ma wpływ na apoptozę komórek w mózgu *Drosophila*, gdyż poziom jej ekspresji w neuronach wpływa na ekspresję genu *hid* i aktywność kaspazy Drone, a charakter tego wpływu zależy od poziomu ekspresji genu *ho*, wieku owadów i typu komórek.

Interesujące są wyniki wskazujące na wpływ poziomu ekspresji genu *ho* na ekspresję innych genów, zaangażowanych w apoptozę i autofagię. Nadekspresja *ho* w neuronach powodowała spadek poziomu ekspresji genu *hid*. Zarówno nadekspresja jak i wyciszenie genu *ho* powodowały podwyższenie poziomu ekspresji u młodych (7-dniowych much) a obniżenie ekspresji genu *hid* u starszych (30-dniowych) much. U młodych much zarówno nadekspresja, jak i wyciszenie genu *ho* powodowało wzrost aktywności kaspazy Drone, natomiast u much 30-dniowych z nadekspresją genu *ho* aktywność kaspazy była niższa niż u much 7-dniowych. Zmieniające się zależnie od wieku muszek zależności stwierdził również Doktorant badając wpływ nadekspresji genu *ho* na ekspresję genów zaangażowanych w proces autofagii (*atg5* i *atg10*). Wyniki te wskazują na złożoność procesów regulujących przeżywalność i częstość apoptozy u *Drosophila* i zmienne efekty modyfikacji poziomu ekspresji genu *ho* na aktywność transkrypcyjną innych genów i poziom aktywności białek. Na uznanie zasługuje więc przyjęcie schematu doświadczalnego uwzględniający wpływ wieku owadów. Ograniczenie doświadczeń do muszek w jednym wieku mogłoby prowadzić do wyciągnięcia uproszczonych i jednostronnych wniosków. Uzyskane wyniki mają na razie charakter fenomenologiczny, jednak mogą stanowić cegiełki konstrukcji, która w przyszłości pozwoli na głębszy wgląd w mechanizmy tych zależności.

Interesujące było wykazanie, że zarówno nadekspresja, jak i wyciszenie genu *ho* zwiększały degenerację neuronów dopaminergicznych. Obniżenie ekspresji genu *ho* wywoływało zaburzenia morfologii oka, jednakże nadekspresja genu *ho* także skutkowa

pewnymi nieprawidłowościami struktury oka. Te i inne obserwacje skłaniają to wyciągnięcia wniosku, że pewien optymalny poziom ekspresji genu *ho* (być może zmienny w funkcji wielu) jest konieczny dla zapewnienia właściwego funkcjonowania mózgu (i innych organów) wywiltzny, natomiast zarówno obniżenie, jak i podwyższenie poziomu ekspresji genu wywiera efekty niekorzystne.

Analiza i dyskusja wyników jest staranna i należyście ostrożna. Doktorant unika wyciągania pochopnych wniosków, biorąc pod uwagę także inne czynniki niż parametr badany w doświadczeniu, np. różnice tła genetycznego między stosowanymi szczepami. Dobre planowanie doświadczeń, solidność dokumentacji wyników i przezorność w wyciąganiu wniosków są istotnymi aspektami warunkującymi moją wysoce pozytywną ocenę rozprawy.

Lektura rozprawy nasunęła mi kilka uwag; oczekiwałbym odniesienia się do nich przez Doktoranta podczas obrony.

Kurkumina jest niewątpliwie świetnym antyoksydantem w układach bezkomórkowych, a także w komórkach, jednak donoszono także o jej prooksydacyjnym działaniu, objawiającym się m. in. podwyższeniem poziomu reaktywnych pochodnych tlenu, prawdopodobnie leżącym u podłoża, a w każdym razie przyczyniającym się do działania przeciwnowotworowego tego związku (*Gupta et al., Molecules, 2020*). Mechanizmy działania prooksydacyjnego kurkuminy na poziomie komórkowym mogą obejmować obniżenie poziomu glutationu wskutek tworzenia koniugatów z glutationem katalizowanego przez *S*-transferazę glutationową (*Usta et al., Chem. Res. Toxicol. 2007*) i hamowania reduktazy glutationowej (*Güller et al., J. Biomol. Struct. Dynamics 2021*). Kurkumina może jednak także podwyższać poziom glutationu aktywując czynnik Nrf2 i zwiększając poziom kontrolowanej przez ten czynnik ligazy  $\gamma$ -glutamylcysteinowej (*Shahcheraghi et al., Molecules, 2021*). Doktorant w dyskusji Publikacji 1 wspomina o indukcji stresu w siateczce endoplazmatycznej i destabilizacji mitochondriów przez kurkuminę. Ostateczny wpływ kurkuminy na stan komórki i organizmu może więc zależeć od czasu i warunków jej działania. Ten nieco przydługi wywód ma na celu jest podbudowanie tezy, że traktowanie kurkuminy jako antyoksydanta może być w pewnym stopniu uproszczeniem. Ciekaw jestem poglądu Doktoranta w tej kwestii.

Intrygujący jest mechanizm wpływu ekspresji genu kodującego oksygenazę hemową na ekspresję innych genów. W przypadku oksygenazy hemowej 1 ssaków stwierdzono, że skrócona (*truncated*) forma białka, pozbawiona sekwencji C-końcowej, jest obecna w jądrze. Podejrzewana jest ona o pełnienie funkcji regulacyjnej i wpływ na ekspresję niektórych genów. Choć nie stwierdzono w jej sekwencji obecności motywu typowego dla czynników transkrypcyjnych, co wyklucza wiązanie się białka z DNA, to jednak przypuszczano, że może mieć funkcję koregulatora transkrypcji poprzez wiązania się z jakimś czynnikiem transkrypcyjnym (*Wu et al., Redox Biol. 2021*). Czy podobna sytuacja może mieć miejsce w przypadku oksygenazy hemowej wywiltzny? Alternatywne wyjaśnienie zakłada wpływ produktów reakcji oksygenazy hemowej na ekspresję innych genów.

Mam też nieco drobnych uwag, natury głównie redakcyjnej.

S. 13: Pojęcie stresu oksydacyjnego mogłoby być zdefiniowane przy pierwszym wprowadzeniu tego terminu.

Fig. 1, legenda: ALAS (syntetaza kwasu delta-aminolewulinowego) nie jest jedynym enzymem biosyntezy hemu, choć kontroluje szybkość jego syntezy.



Nie zgadzam się ze stwierdzeniem: „Both CO and BV can be further reduced to bilirubin (BR) by biliverdin reductase (BVR)” (s. 15), pozostając przy tradycyjnym poglądzie, że jedynie biliwerdyna jest substratem reduktazy biliwerdynowej.

S. 15: Po słowach „by inhibiting reactive oxygen and nitrogen species” winien być wyraz “generation” lub “production”.

S. 16: Zwrot “in neuron excitability” winien być, moim zdaniem, poprzedzony słowem “involved”. Sformułowanie „High heme levels can also accumulate ubiquitinated proteins” nie grzeszy precyzją, zapewne chodzi o zwiększoną akumulację ubikwitylowanych białek w warunkach zwiększonego stężenia hemu.

S. 17: Termin „heme dysfunction” nie wydaje się optymalny, sugerując złe funkcjonowanie cząsteczki; chodzi raczej o zaburzenia metabolizmu hemu („heme metabolism dysfunction”. Termin „proportional” winien być użyty zamiast “proportionate”.

Zwrot “mostly scavenged” winno być zastąpiony przez „mostly scavenge”.

S. 18: Zwrot „high HO-1 mRNA” winien być zastąpiony przez „high levels of HO-1 mRNA”. Zastanawiam się, czy zwrot “homeostatic imbalance” nie jest oksymoronem.

S.19: Zamiast zwrotu „results in the production of free radicals” należałoby użyć zwrotu “results in the increased production of free radicals”.

S. 21: Proponuję zastąpić zwrot “progression of metabolic syndrome (*Jais et al., 2014; Mishra & Ndisang, 2014*), including neurodegenerative and neuroinflammatory disorders” przez “progression of metabolic syndrome [...] and including neurodegenerative and neuroinflammatory disorders”. Bardziej właściwe byłoby stwierdzenie “most likely by competition for the intracellular heme pool” niż “most likely by regulating the intracellular heme pool”. W odniesieniu do “mitochondrial respiration” bardziej właściwe byłoby użycie terminu „process” niż “reaction”.

Nie zgadzam się ze stwierdzeniem (s. 22): „upregulation of HO via hypoxia downregulates the pentose phosphate pathway”; owszem, hipoksja obniża intensywność cyklu pentozofosforanowego, ale nie wskutek podwyższenia ekspresji HO.

S. 33: „is also a compromised biological event, apart from dHO, in response to high metabolic activity...” sugeruję zmianę na “apart from dHO expression..”, gdyż “dHO” trudno uznać za “biological event”.

S. 35: “than those non-treated flies with *ho* overexpression”, moim zdaniem powinno być: “than that of non-treated flies with *ho* overexpression”.

S. 37: “some disadvantages, which should be supported with further investigations”, może zastąpić przez “... which should be considered in further investigations”.

S. 37: “this study's main limitation, which was to quantify protein and activity levels”, lepiej byłoby “...lack of quantification..”.

S. 38: Wniosek 1 mógłby być sformułowany nieco bardziej ogólnie, bez wymieniania parakwatu i kurkuminy jako czynników, które powinny być wzięte pod uwagę przy terapeutycznej optymalizacji funkcji oksygenazy hemowej (ksenobiotyki wpływające na poziom enzymu owszem, ale niekoniecznie zwłaszcza parakwat warto byłoby w tym celu używać).

S. 38: Trudno mi się zgodzić ze sformułowaniem: „apoptosis and autophagy [...], which are key signaling pathways in maintaining cellular homeostasis”, moim zdaniem apoptoza i autofagia to efekty działania szlaków sygnalizacji, a nie szlaki sygnalizacji.

W Fig. 7 i 8, skądinąd pomysłowo syntetycznych, znaki równości w prawej górnej części (wyjaśnione dopiero w legendzie Fig. 8) nie są najodpowiedniejsze; znak równości ma ściśle określone znaczenie w matematyce i logice.

S. 57: Stwierdzenie zawarte w abstrakcie publikacji nr 1: „15 days of curcumin feeding restored this rhythm” nie jest, moim zdaniem, właściwe; “preserved” byłoby bardziej odpowiednim słowem niż „restored”, bowiem nie chodzi o przywrócenie rytmu okołodobowego po jego zaniku, ale o jego zachowanie u muszek, którym podawano kurkuminę. Termin „prevented” jest zresztą stosowany przy opisie wyników w tej publikacji.

S. 58: Zwrot „organism’s body” wydaje mi się być pleonazmem, choć rozumiem, że Doktorant miał na myśli resztę ciała poza mózgiem.

Nie sądzę, by odpowiedziami na te drobne uwagi warto będzie zajmować czas podczas obrony rozprawy, jednak chciałbym je przekazać Doktorantowi do rozważenia.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana Terence Al L. Abaquita wnosi nowe, wiarygodne i interesujące dane o roli oksygenazy hemowej w mózgu *Drosophila melanogaster*, a moja ocena rozprawy jest wysoce pozytywna. Rozprawa spełnia wymogi określone w artykule 187 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym z dnia 20 lipca 2018 roku. Prezentuje ona ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Wnoszę więc o dopuszczenie Pana Terence Al L. Abaquita do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Grzegorz Batorz*

Rzeszów, 29 maja 2023