



WOJSKOWY INSTYTUT HIGIENY I EPIDEMIOLOGII
im. gen. Karola Kaczkowskiego
01-163 Warszawa, ul. Kozielska 4
tel. 261 853 101 fax 261 853 133
e-mail: kancelaria.jawna@wihe.pl

dr hab. n. med. Małgorzata Krzyżowska, prof. WIHiE
Kierownik Zakładu Medycyny Regeneracyjnej
Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii
w Warszawie

Warszawa, 15.06.2022

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Miriam Mojżesz

pt.” Zaangażowanie szlaku interferonu I w odpowiedzi przeciwwirusowej u ryb”

Praca wykonana w Zakładzie Immunologii Ewolucyjnej Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Promotor: prof. Dr hab. Magdalena Chadzińska i dr hab. Krzysztof Rakus

Akwakultura stanowi istotny element światowej gospodarki rolno-spożywczej. Infekcje wirusowe ryb są poważnym zagrożeniem dla rozwoju tej dziedziny gospodarki ze względu na możliwość dużych strat wywołanych szybkim szerzeniem się patogenów w środowisku wodnym. Istnieje zatem konieczność prowadzenia badań podstawowych w zakresie mechanizmów wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej u ryb, co może w przyszłości przyczynić się do rozwoju akwakultur, ale również do ochrony szeroko pojętych siedlisk ryb w obliczu zagrożenia wyginięciem. Danio pręgowany (*Danio rerio*) zaliczany do karpiowatych stanowi doskonały organizm modelowy, o dobrze poznanej biologii, scharakteryzowanym genomie i łatwości manipulacji w warunkach laboratoryjnych.

Przedstawiona do oceny dysertacja zawiera na 152 stronach wszystkie wymagane rozdziały. We wstępie Doktorantka opisuje szczegółowo ryby karpioвате wykorzystywane do badań odpowiedzi przeciwwirusowej oraz charakteryzuje zakażenia wirusowe stanowiące największe zagrożenie dla hodowli, takie jak wirus wiosennej wiremii karpia (*spring viremia*

of carp virus, SVCV), *chum salmon reovirus* (CSV) oraz wirus TiLV (*tilapia lake virus*). Wymienione zakażenia wirusowe ryb są w dalszej części przedmiotem badań Autorki.

W dalszej kolejności Doktorantka szczegółowo opisuje udział receptorów rozpoznających wzorce (PRP), tym receptory RLR (RIG-I-like receptors) oraz nienależące do RLR DExD/H-box RNA helikazy i ich udział w przebiegu transdukcji sygnału odpowiedzi przeciwwirusowej w komórce. Następnie w sposób wyczerpujący opisuje występowanie i rolę interferonów typu I oraz cytokin prozapalnych u ryb. Szczegółowość przedstawionego opisu odpowiada treści pracy przeglądowej stanowiącej skład rozprawy doktorskiej, zatytułowanej „Cytosolic sensors for pathogenic viral and bacterial nucleic acids in fish” opublikowanej w *International Journal of Molecular Sciences*, 2020; 21:7289. Przedstawiona praca przeglądowa, w której Doktorantka ocenia swój udział na 30%, jest wszechstronną, porównawczą pracą przeglądową umożliwiającą poznanie wewnątrzkomórkowych sensorów rozpoznających PRP oraz uruchamianych przez nie szlaków odpowiedzi immunologicznej u ryb. Na szczególną uwagę w tej pracy zasługuje wysiłek włożony w charakterystykę oraz ocenę roli szlaków molekularnych u ryb w porównaniu do pozostałych kręgowców, w tym głównie ssaków.

W dalszej części wstępu Autorka opisuje szczegółowo mechanizmy wrodzonej odporności przeciwwirusowej w obrębie centralnego układu nerwowego u ryb, ze szczególnym uwzględnieniem roli komórek glejowych: astrocytów i mikrogleju. Szeroko opisane zostały zachowania chorobowe, czyli zjawisko zmian zachowania zwierząt podczas infekcji i/lub zapalenia, oraz rola cytokin prozapalnych w regulacji łaknienia, aktywności lokomotorycznej oraz w indukcji tzw. gorączki behawioralnej.

W mojej opinii wstęp do rozprawy stanowi dobre i wyczerpujące wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej. W swojej rozprawie doktorskiej Doktorantka postawiła hipotezę badawczą zakładającą, że szlak aktywacji IFN typu I w odpowiedzi przeciwwirusowej jest silnie konserwatywny, a opisane u ssaków DExD/H-box RNA helikazy są także zaangażowane w aktywację odpowiedzi przeciwwirusowej u ryb. Ponadto, założono, że szlak Ifn typu I aktywowany w wyniku infekcji wirusowej mózgu prowadzi do stanu zapalnego i powiązanych z nim zmian zachowania zwierząt. Cel badawczy Doktorantka realizowała przy użyciu dwóch gatunków ryb karpiowatych – danio pręgowanego oraz karpia, zakażanych trzema wirusami: SVCV, CSV oraz TiLV.

Wyniki badań Doktorantka przedstawiła w formie dwóch publikacji oryginalnych. W pierwszej publikacji zbadała rolę DExD/H-box RNA helikaz (Dx1, Dx3, Dx9, Dx21, Dx36) w

aktywacji nieswoistej odpowiedzi przeciwwirusowej u ryb. W publikacji posłużyła się metodami analizy filogenetycznej pięciu form helikaz RNA, a następnie sprawdziła poziom ich ekspresji konstytutywnej w tkankach danio pręgowanego i karpia, oraz linii komórkowej ZF4. Wyniki pokazały obecność transkryptów wszystkich pięciu helikaz w badanych tkankach oraz wzrost ekspresji wybranych helikaz podczas infekcji komórek ZF4 wirusem SVCV oraz w tkankach danio pręgowanego oraz karpia zakażonych SVCV i CSV. Jak słusznie zauważyła Doktorantka w Dyskusji, udało się wykazać, że helikazy RNA mogą być zaangażowane w aktywację wrodzonej odpowiedzi przeciwwirusowej, chociaż miarodajną odpowiedź na to pytanie mogłyby przynieść badania z wykorzystaniem mutantów z wyłączonymi genami helikaz, a w szczególności genu *ddx1*.

W drugiej publikacji oryginalnej Doktorantka podjęła się określenia ekspresji genów szlaku IFN typu I oraz cytokin pro- i przeciwzapalnych, zbadania aktywacji mikrogleju i astrocytów w mózgu danio pręgowanego podczas zakażenia wirusem TiLV oraz opisanie zachowań chorobowych ryb w przebiegu tego zakażenia. Praca ta stanowi oryginalny wkład badawczy w poznanie długotrwałej neuroinfekcji u ryb oraz jej wpływu na neurozapalenie oraz zachowanie ryb. Najciekawszym aspektem tej pracy jest wykazanie długotrwałego występowania zakażenia TiLV w mózgu (do 90 dni po zakażeniu) oraz powiązanego z nim stanu zapalnego utrzymującego się do 45 dni po zakażeniu. Długotrwały stan zapalny w wyniku utrzymującego się zakażenia mózgu jest zjawiskiem dość powszechnie stwierdzanym u ssaków, jednak do chwili obecnej mało zbadanym dla ryb. Stanowi to o oryginalności przeprowadzonych badań oraz ich wkładzie w stan wiedzy o neurozapaleniu u kręgowców. W dalszej kolejności pracy zawarte są obserwacje korelacji neurozakażenia ze zmianami zachowania (krótszy dystans, zmniejszona aktywność lokomotoryczna, nietypowy ruch spiralny), spadek wagi ciała u osobników dorosłych, zakażonych TiLV.

Ważną częścią rozprawy doktorskiej jest przeprowadzona na 12 stronach Dyskusja, w której omówione zostały uzyskane wyniki w oparciu o ponad 200 pozycji literaturowych oraz cztery tabele poglądowe. Autorka dokonuje wszechstronnej i celnej analizy, nie uciekając od możliwości alternatywnych wyjaśnień uzyskanych wyników w stosunku do zakładanej hipotezy badawczej, co świadczy o dojrzałości naukowej i umiejętności krytycznego spojrzenia na pozyskane wyniki. Autorka formułuje wnioski w ścisłym powiązaniu z uzyskanymi wynikami badań.

W obowiązku recenzenta pozostaje mi jednak zadać pytania związane bezpośrednio ze sposobem wykonywania badań, który mógł wpływać na wyniki i ich interpretację.

- Czy zakażenie TiLV można uznać za infekcję persystentną? Czy coś wiadomo na temat komórek (astrocyty/neurony, komórki endotelialne), które zakaża TiLV? Mikroglej zazwyczaj nie ulega zakażeniu, podobnie jak monocyty, ze względu na silną i szybką odpowiedź nieswoistą. Zatem jakie komórki stanowią miejsce długotrwałego zakażenia (persystencji) TiLV w mózgu danio rerio?

- Dlaczego badania behawioralne przeprowadzono w 6 i 11 dniu po zakażeniu, wiedząc (lub nie), że infekcja utrzymuje się do 90 dnia po zakażeniu, zaś neurozapalenie do 45? Zbadanie zmian w zachowaniu w dłuższej perspektywie czasowej wniosłoby dużą wartość do zbadania korelacji neurozapalenie wywołane długotrwałym zakażeniem a zmiany w zachowaniu ryb.

- Aktywację mikrogleju zbadano w ciągu 48h przy wykorzystaniu transgenicznych larw *Tg(mpeg1.1:mCherryF)ump2* posługując się obrazami pozyskanymi przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Zważywszy na możliwość naciekania tkanki mózgu przez monocyty obwodowe, w jaki sposób Doktorantka wykluczyła możliwość zaliczenia do ameboidalnych form mikrogleju obwodowych makrofagów/monocytów zapalnych naciekających miejsca zakażenia?

- Czy Doktorantka rozważała możliwość wykonania badań histopatologicznych/przy użyciu mikroskopii konfokalnej mających na celu zidentyfikowanie charakteru nacieku/komórek biorących udział w neurozapaleniu w 14-45 dniu po zakażeniu TiLV u osobników dorosłych? Wzrost ekspresji cd68 oraz csf1r wskazywałby na udział mikrogleju o fenotypie M1 (prozapalnym), jednak z badań nad innymi długotrwałymi neurozapaleniami wywoływanymi przez wirusy (np. HSV-1) wiadomo, że mikroglej może przyjmować formy pośrednie pomiędzy formą prozapalną M1 a przeciwzapalną M2.

- Czy fakt pojawienia się markera astrocytów we wczesnej fazie zakażenia TiLV należy uznać za typową dla neurozakażeń wirusowych astrocytozę?

- Na str 26 Wstępu Autorka wspomina o roli, jaką astrocyty odgrywają w aktywacji i kontrolowaniu migracji komórek odpornościowych, w tym mikrogleju na terenie CUN. Trudno się z tym do końca zgodzić, ponieważ w przypadku wielu innych zakażeń CUN (wirus ściekliczny bądź HSV) do mikrogleju należy aktywacja wczesnej, wrodzonej odpowiedzi immunologicznej mającej na celu aktywację obwodowych, peryferyjnych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej, jak również aktywacja astrocytów. Tej informacji zabrakło.

- Czy fakt utrzymywania się neurozakażenia u danio pręgowanego można jakoś powiązać z biologią wirusa TiLV? Jest to efekt niespecyficzny zakażenia, czy też stanowi element jakiejś strategii ewolucyjnej?

- Autorka pisze we wstępie o IL-8, jako o cytokinie prozapalnej. Oznaczenie genu *cxcl8* sugeruje chemokinę. Być może należałoby to wyjaśnić celem uniknięcia nieścisłości. Praca doktorska zawiera kilkanaście drobnych błędów edytorskich bez związku z wartością merytoryczną, które pomijam.

Rozprawa doktorska mgr Miriam Mojżesz jest napisana starannie, logicznie a poziom merytoryczny świadczy o dużej wiedzy Autorki i umiejętności jej wykorzystania przy formułowaniu założeń pracy i dyskusji wyników.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest oryginalnym i wartościowym dorobkiem mgr Miriam Mojżesz wniesionym do wiedzy o mechanizmach aktywacji wrodzonych reakcji obronnych podczas infekcji wirusowej u ryb, jak również do wiedzy dotyczącej ewolucyjnie konserwatywnych mechanizmów funkcjonowania odpowiedzi przeciwwirusowej.

Podsumowując, rozprawa doktorska spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i tym samym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie magister Miriam Mojżesz do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne oraz wnioskuję o jej wyróżnienie.

