

Daria Reczyńska

Ekspresja białek ostrej fazy i katelicydyn w komórkach krwi i mleka kóz mlecznych w odpowiedzi na zakażenie lentiwirusem małych przeżuwaczy (SRLV)

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu

Praca doktorska przygotowana pod kierunkiem
prof. dr hab. Emilii Bagnickiej – promotora
oraz dr. Michała Czopowicza – promotora pomocniczego
Praca wykonana w ramach projektów badawczych:
NCN2013/09/B/NZ6/03541 oraz NCN2016/21/N/NZ9/01508

Recenzenci:

Dr hab. Aleksandra Platt-Samoraj, prof. UWM
Katedra Epizootiologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Dr hab. Anna Radko
Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie

10. Streszczenie

W obronie organizmu przed bakteriami, wirusami i grzybami biorą udział liczne białka i peptydy przeciwdrobnoustrojowe, takie jak białka ostrej fazy (BOF) i katelicydyny. Jednym z głównych patogenów kóz i owiec jest lentiwirus małych przeżuwaczy (SRLV), wywołujący wirusowe zapalenie stawów i mózgu (CAE). Zakażenie nim powoduje duże straty ekonomiczne i obniża dobrostan zwierząt. Do tej pory brak jest skutecznych metod leczenia. Poznanie szerokiego spektrum działania układu odpornościowego, w tym mechanizmów epigenetycznych może dostarczyć wiedzy użytecznej w pracach nad skutecznymi metodami zwalczania CAE.

Celem prowadzonych badań było określenie wpływu zakażenia SRLV kóz mlecznych na ekspresję genów białek ostrej fazy oraz katelicydyn na poziomie mRNA w komórkach somatycznych mleka i leukocytach krwi oraz na poziomie białka w mleku i surowicy krwi, aby zidentyfikować dodatkowy wskaźnik zakażenia, jak również przeanalizowanie poziomu ekspresji wybranych genów miRNA, mogących mieć wpływ na ekspresję genów białek ostrej fazy i katelicydyn.

Badanie przeprowadzono na 24 kozach rasy polskiej białej uszlachetnionej i polskiej barwnej uszlachetnionej. Próbkę mleka i krwi pobrano pięć razy podczas laktacji (w 1., 30., 60., 140. i 200. dniu laktacji). Poziom ekspresji genów BOF i katelicydyn oraz wybranych miRNA w komórkach somatycznych mleka (KSM) i leukocytach krwi (WBC) ustalono za pomocą metody Real Time PCR, zaś poziom białka w mleku i surowicy krwi przy użyciu testów ELISA.

W niniejszych badaniach u kóz wolnych od zakażenia i zakażonych SRLV odnotowano wyższą ekspresję *Cp* i niższą *Fbγ* w WBC, a także wyższe stężenie SAA, Hp i CRP w mleku w porównaniu do surowicy krwi. Ponadto u kóz zakażonych SRLV stwierdzono niższą ekspresję MAP28 (mRNA i białko) w WBC/ surowicy krwi.

Wykazano wzrost ekspresji dwóch genów dodatnich BOF – *SAA* i *Hp* w KSM mleka oraz *Hp* w WBC kóz zakażonych SRLV w porównaniu do wolnych od zakażenia. Nie odnotowano natomiast zmian zachodzących pod wpływem lentiwirusa w przypadku innych BOF i katelicydyn na poziomie mRNA. W mleku kóz zakażonych SRLV wykazano niższe stężenie białka SAA, *Cp*, MAP28 oraz wyższe MAP34 w porównaniu do kóz wolnych od zakażenia. Wyższą ekspresję białka SAA stwierdzono w surowicy krwi kóz zakażonych SRLV w porównaniu do kóz wolnych od zakażenia.

Odnotowano różnice w ekspresji BOF i katelicydyn w przebiegu laktacji w KSM kóz zakażonych SRLV. W okresie okołoporodowym i na początku laktacji wykazano najniższą ekspresję *SAA* i *MAP34*. Ponadto okres ten charakteryzował się wyższym poziomem transkryptów *Cp*. W szczycie i pełnej laktacji obserwowano najwyższą ekspresję genów *Cp*, *Fba*, *Fbγ*, *AGP*, *CRP* oraz *LALBA* w WBC kóz zakażonych, przy czym w tym okresie obserwowano najniższy poziom transkryptów *SAA*. Pod koniec laktacji u kóz zakażonych SRLV obserwowano wzrost stężenia *Cp* i *AGP* w mleku oraz *Hp* w surowicy krwi, podczas gdy poziom *SAA* w mleku, a także *AGP* i *MAP34* w surowicy krwi obniżył się.

Najwyższą ekspresję *Cp* odnotowano w okresie okołoporodowym (1. dzień) w KSM (mRNA) i pod koniec laktacji (200. dzień) w mleku (białko) kóz wolnych od zakażenia. W WBC kóz wolnych od zakażenia najwyższy poziom transkryptów *SAA* stwierdzono na początku laktacji, zaś *Cp*, *Fba*, *Fbγ*, *AGP*, *CRP*, *LALBA* i *BAC7.5* w szczycie i pełnej laktacji. W surowicy krwi kóz wolnych od zakażenia najwyższe stężenie *Cp* stwierdzono w okresie okołoporodowym, zaś najmniejsze pod koniec laktacji.

Wyższą ekspresję miR-214-3p i tendencję do wyższej ekspresji miR-221-5p odnotowano w KSM w porównaniu do WBC kóz zakażonych SRLV. W okresie okołoporodowym (1. dzień) w WBC zarówno kóz wolnych jak i zakażonych SRLV zaobserwowano najwyższy poziom transkryptów miR-30e-5p. Ponadto w WBC kóz wolnych od zakażenia w okresie okołoporodowym i w szczycie laktacji (60. dzień) stwierdzono wyższy poziom transkryptów miR-93-5p w porównaniu do początku laktacji (30. dzień).

Zwiększonemu stężeniu *SAA* w surowicy krwi towarzyszy obniżone stężenie *SAA* i *Cp* w mleku zakażonych kóz. *SAA* hamuje wytwarzanie przeciwciał i reakcję zapalną oraz prawdopodobnie pobudza różnicowanie się monocytów do makrofagów, zatem podwyższona ekspresja tego białka we krwi „pomaga” wirusowi w namnażaniu się i zakażaniu kolejnych komórek (monocytów i makrofagów) w sposób ciągły. Natomiast obniżone stężenie *SAA* w mleku może świadczyć o hamowaniu namnażania się wirusa. Ponadto, obniżenie stężenia *Cp* w mleku prawdopodobnie powoduje zwiększenie stężenia wolnych rodników i reaktywnych form tlenu, niszczących czynniki chorobotwórcze. Zatem, obniżone stężenie tych dwóch BOF może wskazywać, iż w tkankach wymienia, w przeciwieństwie do całego organizmu, pobudzone są niektóre mechanizmy odpornościowe. Jednak niski wzrost lub spadek stężenia *SAA*, *Hp* i *Cp* wskazuje, iż białka te w przebiegu zakażenia SRLV u kóz należą do grupy „*minor acute phase proteins*”.

Brak różnic między stężeniami innych BOF w mleku i surowicy krwi może również oznaczać, że SRLV ma zdolność do niewzbudzania produkcji większości BOF.

Wyższa ekspresja miR214-3p i tendencja do wyższej ekspresji miR-221-5p w KSM w porównaniu do WBC również wskazuje na odmienną odpowiedź immunologiczną całego organizmu w stosunku do tkanek wymienia w odpowiedzi na zakażenie SRLV. Wyższy poziom transkryptów miR-214 i miR-221 w KSM kóz zakażonych może świadczyć o podjęciu obrony przez układ immunologiczny na poziomie lokalnym. Natomiast niższy poziom ekspresji w WBC zwierząt zakażonych może świadczyć, że SRLV ma zdolność do wyciszania ekspresji genu miR-214 w tym materiale biologicznym, co być może również pozwala wirusowi na namnażanie się i zakażanie kolejnych komórek.

miR-93-5p jest zaangażowane w regulację procesów zachodzących podczas laktacji w KSM, jednak jego ekspresja nie ulega zmianie pod wpływem zakażenia SRLV. Konieczne są jednak dalsze badania nad miRNA w celu wyjaśnienia procesów zachodzących w całym organizmie, a w szczególności w wymieniu kóz zakażonych SRLV.

11. Summary

Many proteins and peptides, such as acute phase proteins (APP) and cathelicidins participate in the immune response against bacterial, viral or fungal infections. One of the major pathogens in goats and sheep is small ruminant lentivirus (SRLV) which causes considerable economic losses and negatively affects animal welfare. So far there is no effective treatment available. The knowledge of the broad spectrum of activity of the immune system, including epigenetic mechanisms, could be used to develop the effective pharmaceuticals against SRLV infection.

The aim of the study was to determine of the effect of SRLV infection of dairy goats on the acute phase protein and cathelicidin genes expression at mRNA level in milk somatic cells (MSC) and blood leucocytes (WBC) as well as at the protein level in milk and blood serum to indentified additive biomarker of SRLV infection as well as to analysis of selected miRNA gene expressions.

The experiment was conducted on 24 dairy goats of Polish White and Polish Fawn Improved breeds. The samples of milk and blood were collected five times during lactation (at 1st, 30th, 60th, 160th, 200th day of lactation). The levels of APP, cathelicidin and miRNA genes in MSC and blood leukocytes were established using Real Time PCR method, while the protein levels in milk and blood serum were measured using ELISA tests.

This study showed higher expression of *Cp* and lower expression of *Fby* in WBC in both SRLV-free and infected goats and also, the higher level of SAA, Hp, and CRP in milk compared to blood serum. Moreover, there was a lower expression of MAP28 (at mRNA and protein levels) in WBC/blood serum of SRLV-infected goats.

There was higher expression of two positive APP genes - *SAA* and *Hp* in milk somatic cells and, additionally, higher level of *Hp* in WBC of infected goats than in the samples from SRLV-free goats. However, there were no changes in the expression of other APP and cathelicidin genes at the mRNA level in SRLV-infected goats. A lower level of SAA, *Cp*, MAP28 and a higher level of MAP34 were found in the milk of SRLV-infected goats compared to the milk of non-infected ones. A higher expression of SAA was identified in the blood serum of SRLV-infected goats at the protein level as compared to non-infected animals.

During lactation, the lowest expressions of *SAA* and *MAP34* were found in the perinatal period and at the beginning of lactation in MSC of SRLV-infected goats. Moreover, a higher level of *Cp* transcripts was observed in these stages of lactation. At the peak and full lactation,

the highest expression of *Cp*, *Fba*, *Fby*, *AGP*, *CRP* and *LALBA* genes in WBC of infected goats, while the lowest level of *SAA* transcripts was recorded. At the end of lactation, the increased concentration of *Cp* and *AGP* in milk and *Hp* in blood serum was observed in SRLV-infected goats, while the concentration of *SAA* in milk as well as *AGP* and *MAP34* in their blood serum decreased.

In the milk from goats free from SRLV infection, the highest expression of *Cp* (mRNA and protein levels) was identified in MSC in the perinatal period (first day after parturition) and at the end of lactation (at day 200). In blood leukocytes of goats free from SRLV infection, the highest level of *SAA* transcripts was found at the early stage of lactation (day 30), while the lowest levels of *Cp*, *Fba*, *Fby*, *AGP*, *CRP*, *LALBA* and *BAC7.5* were observed at the peak lactation and full lactation. Blood serum samples of goats free from SRLV infection had the highest concentration of *Cp* in the perinatal period. *Cp* reached its lowest level at the end of lactation.

In SRLV-infected goats, a higher expression of miR-214-3p and a tendency for higher expression of miR-221-5p were recorded in MSC compared to the blood leukocytes. In the perinatal period (on day 1 after kidding), the highest level of miR-30e-5p transcripts was observed in the blood leukocytes from non-infected goats as well as in the ones from SRLV-infected goats. In addition, a higher transcripts level of miR-93-5p was found at the perinatal period (on day 1) and at the peak of lactation (on day 60) in blood leukocytes of non-infected goats than the one observed in the early stage of lactation (at day 30).

The higher concentration of *SAA* in WBC is accompanied by the reduced concentration of *SAA* and *Cp* in the milk of SRLV-infected goats. Since *SAA* inhibits production of antibodies and inflammatory reaction as well as probably activates the differentiation of monocytes to macrophages, its elevated expression in the blood may facilitate the virus multiplication and infection of next cells. Whereas, decreased concentration of *SAA* in the milk may indicate the inhibition of the virus multiplying process. Simultaneously, increased concentration of *Cp* in milk is probably connected with increased concentration of free radicals and reactive oxygen species which destroy pathogens. Thus, the reduced concentration of those two APPs may indicate that the udder, in contrast to the whole organism, fights the virus. The lack of the differences in other APP concentrations between infected and non-infected goats both in milk and blood serum may also mean that the SRLV is able to be neutral to most of the APPs, without inducing the immune response of the host. However, low level of fluctuation of *SAA*, *Hp* and *Cp* concentrations indicate the appurtenance of these proteins to minor acute phase proteins group.

The higher expression of miR214-3p and a tendency for higher expression of miR-221-5p in milk somatic cells compared to WBC also indicates that the udder defends itself against the virus. However, a lower level of expression in WBC of SRLV infected animals may indicate that SRLV has the ability to silence the expression of the miR-214 gene in this biological material. miR-93-5p is also involved in the regulation of processes occurring during lactation in milk somatic cells, however, its expression under the influence of SRLV infection remains unchanged.