

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
Zakład Wirusologii

Paweł Mirosław

Charakterystyka molekularna szczepów wirusa biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVDV) oraz analiza transkryptomu komórek zakażonych tym wirusem

Molecular characteristics of bovine viral diarrhoea and mucosal disease virus (BVDV) strains and transcriptome analysis of cells infected with this virus

Praca doktorska

Promotor pracy:

dr hab. Mirosław Polak prof. inst.

Zakład Wirusologii

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

Promotor pomocniczy:

dr hab. Marzena Rola – Łuszczak

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

Zakład Biochemii/Zakład Analiz Omicznych

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

Recenzenci:

prof. dr hab. Łukasz Adaszek

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

prof. dr hab. Jarosław Kaba

Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej, Instytut Medycyny

Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Puławki, 2021

Streszczenie

Wirus biegunki bydła (BVDV) należy do rodziny *Flaviviridae* oraz rodzaju *Pestivirus*. Zakażenie BVDV wywołuje chorobę o szerokim spektrum objawów klinicznych, najczęściej łagodnych, mimo to zakażenia tym wirusem stanowią poważny problem ekonomiczny na całym świecie. Wirus charakteryzuje się dużą zmiennością genetyczną, a akumulacja pojedynczych mutacji prowadzi do powstawania kolejnych wariantów. Celem pracy było genotypowanie aktualnie występujących szczepów wirusa BVD na terenie Polski oraz, aby lepiej zrozumieć skomplikowaną etiologię choroby na poziomie molekularnym, analiza transkryptomu komórek zakażonych tym wirusem. Materiał do badań filogenetycznych stanowiły próbki pobrane w latach 2015 – 2018 z polskich stad. RT-PCR przeprowadzono stosując pary starterów flankujących 5'UTR oraz regiony kodujące białka N^{pro} i E2. Wygenerowane produkty poddawano sekwencjonowaniu. W badaniach transkryptomowych wykorzystywano ciągłą linię komórkową nerki bydłowej (MDBK), którą zakażano odpowiednio cytopatycznym (cp) szczepem referencyjnym oraz dwoma niecytopatycznymi (ncp) szczepami terenowymi wirusa BVD. Izolację RNA przeprowadzono w dwóch odstępach czasowych (24 oraz 72h po zakażeniu). Wirus BVD wykryto w 30 stadach. Zidentyfikowano siedem podtypów gatunku BVDV-1: 1b, 1g, 1f, 1d, 1r, 1s i 1e w tym podtypy 1s oraz 1r po raz pierwszy w Polsce. Wyniki analizy mikromacierzowej ujawniły zmienioną ekspresję szeregu genów. Zmianom ekspresji uległo 5222 oraz 4395 genów odpowiednio 24 oraz 72h po zakażeniu szczepem cp oraz 1138 i 992 geny po zakażeniu szczepami ncp ($FC \geq 1,5$; $FDR \leq 0,05$). Geny, których ekspresja uległa zmianie na skutek zakażenia szczepem cp wzbogaciły dużą liczbę szlaków przemian komórkowych. Były to głównie szlaki biorące udział w cyklu komórkowym, regulacji ekspresji genów i odpowiedzi immunologicznej natomiast geny o zmniejszonej ekspresji wzbogaciły głównie szlaki związane z metabolizmem. Geny, których ekspresja uległa zmianie na skutek zakażenia szczepami ncp wzbogaciły znacznie mniejszą ilość szlaków między innymi: szlak biosyntezy seryny przez geny, których ekspresja wzrosła czy szlaki związane z elementami wrodzonej odpowiedzi immunologicznej przez geny, które uległy obniżonej ekspresji. Badania filogenetyczne mogą mieć pozytywny wpływ na eliminację wirusa poprzez wykorzystanie nowych informacji w opracowaniu skuteczniejszych szczepionek i testów diagnostycznych. Wyniki badań mikromacierzowych pomogą w lepszym zrozumieniu odpowiedzi gospodarza na zakażenie BVDV-1.

Summary

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) belongs to the *Flaviviridae* family and the genus of *Pestivirus*. Infection with BVDV causes a disease with a wide spectrum of clinical symptoms, most often mild but infections with this virus constitute a serious economic problem all over the world. The virus is characterized by high genetic variability, and the accumulation of single mutations leads to the formation of its subsequent variants. Aim of this study was to genotyping currently circulating BVD viruses in Poland and to better understand the complicated etiology of the disease at the molecular level - analysis of the transcriptome of cells infected with this virus. The material for phylogenetic studies were samples collected in 2015-2018 from Polish herds. RT-PCR was performed using pairs of primers flanking 5'UTR, N^{pro} and E2 encoding regions. The generated products were sequenced. The bovine kidney cell line (MDBK), the cytopathic (cp) reference strain and two non-cytopathic (ncp) BVD virus field strains were used in the transcriptomic studies. RNA isolation was performed at two time intervals (24 and 72 hours after infection). BVD virus was detected in 30 herds. Seven subtypes of BVDV-1 species have been identified: 1b, 1 g, 1f, 1d, 1r, 1s and 1e (1s and 1r subtypes for the first time in Poland). The results of the microarray analysis revealed changes in the expression of numerous genes. 5222 and 4395 genes changed expression 24 and 72h after infection respectively with the cp strain, 1138 and 992 genes after infection with ncp strains ($FC \geq 1,5$; $FDR \leq 0,05$). Genes with changed expression as a result of infection with the cp strain enriched a number of pathways, genes with increased expression enriched mainly pathways involved in the cell cycle, regulation of gene expression and immune response, while genes with reduced expression enriched pathways related to metabolism in a particularly large number. Genes with changed expression as a result of infection with ncp strains enriched a much smaller number of pathways, among them: serine biosynthetic pathway enriched by genes with increased expression or related to the innate immune response by genes with reduced expression. Phylogenetic studies can have a positive effect on virus eradication by using it to develop more effective vaccines and diagnostic tests. Results of microarray studies can help in better understanding the host's response to BVDV-1 infection.