

# Załącznik 2

## AUTOREFERAT

### opis dorobku i osiągnięć naukowych

**Dr Paweł Brym**

Katedra Genetyki Zwierząt

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

ul. Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn

tel. (089) 523 49 82

kom. 606 335 516

e-mail: [pawbrym@uwm.edu.pl](mailto:pawbrym@uwm.edu.pl)

Olsztyn 2018

<i><b>Spis treści</b></i>	<i><b>Strona</b></i>
1. Dane personalne	3
2. Posiadane dyplomy stopnie naukowe/artystyczne z podaniem nazwy, miejsca i roku uzyskania	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z artykułu 16 ustęp 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)	4
5. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	5
6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	21
7. Podsumowanie dorobku naukowego	26

## 1) DANE PERSONALNE

Imię i nazwisko: **Paweł Brym**  
Data urodzenia: 10. 11. 1975  
Miejsce urodzenia: Olsztyn  
Miejsce pracy: **Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie**  
**Wydział Bioinżynierii Zwierząt**  
**Katedra Genetyki Zwierząt**  
Dane kontaktowe: **Katedra Genetyki Zwierząt UWM w Olsztynie**  
**ul. Oczapowskiego 5**  
**10-719 Olsztyn**  
**Tel. (089) 523 49 82**  
**Kom. 606 335 516**  
**e-mail: pawbrym@uwm.edu.pl**

## 2) POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE/ARTYSTYCZNE Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU UZYSKANIA

21.06.1999 tytuł: **magister**, studia magisterskie na kierunku biologia, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Wyższa Szkoła Pedagogiczna w Olsztynie, tytuł pracy magisterskiej: „*Oznaczenie produktów nieenzymatycznej glikacji ludzkiej hemoglobiny testem immunoenzymatycznym ELISA*”, promotor pracy magisterskiej: prof. dr hab. Elżbieta Kostyra

25.05.2004 stopień naukowy: **doktor nauk rolniczych**, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, tytuł rozprawy doktorskiej: „*Identyfikacja polimorfizmu genów prolaktyny, receptora prolaktyny i czynnika transkrypcyjnego STAT5A u bydła*”, promotor w przewodzie doktorskim: dr hab. Stanisław Kamiński

## 3) INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH

01.11.1999 – 25.05.2004 – Katedra Genetyki Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, doktorant

01.11.2004 – 30.11.2004 – Katedra Genetyki Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, asystent

01.12.2004 – do chwili obecnej – Katedra Genetyki Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, adiunkt

**4) WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)**

Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

**Genomiczne determinanty odpowiedzi bydła na zakażenie wirusem BLV (*Bovine Leukemia Virus*)**

PRACE WSKAZANE JAKO SZCZEGÓLNE OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Publikacja	IF	pkt	Liczba cytowani
H1. <b>Brym P.*</b> , Ruś A., Kamiński S. <b>2013</b> <i>Evaluation of reference genes for qRT-PCR gene expression studies in whole blood samples from healthy and leukemia virus infected cattle</i> <b>Veterinary Immunology and Immunopathology 153: 302-307</b> . DOI: 10.1016/j.vetimm.2013.03.004	1,748	30	11
H2. <b>Brym P.*</b> , Kamiński S. <b>2017</b> <i>Microarray analysis of differential gene expression profiles in blood cells of naturally BLV-infected and uninfected Holstein-Friesian cows</i> . <b>Molecular Biology Reports 44: 109-127</b> . DOI: 10.1007/s11033-016-4088-6	1,828	15	2
H3. <b>Brym P.*</b> , Zabołewicz T., Kamiński S. <b>2018</b> <i>Differential expression of complement subcomponent C1qA in blood samples of healthy and BLV-infected Polish Holstein-Friesian cows</i> . <b>Animal Science Papers and Reports 36: 45-55</b> .	0,725	25	0
H4. <b>Brym P.*</b> , Bojarojć-Nosowicz B., Oleński K., Hering D.M., Ruś A., Kaczmarczyk E., Kamiński S. <b>2016</b> <i>Genome-wide association study for host response to bovine leukemia virus in Holstein cows</i> . <b>Veterinary Immunology and Immunopathology 175: 24-35</b> . DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.04.012	1,664	25	2
<b>Razem</b>	<b>5,965</b>	<b>95</b>	<b>15</b>

\* - autor korespondencyjny

Wartości punktowe MNiSW (wg wykazu czasopism punktowanych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego) oraz wartości wskaźników IF (Impact Factor wg listy Journal Citation Reports - JCR) poszczególnych prac podano zgodnie z rokiem wydania publikacji. Liczbę cytowań podano według baz Web of Science i Scopus (z dnia 01 października 2018 roku). Wkład Wnioskodawcy w wyżej wymienione prace przedstawiono w załączniku nr 4, natomiast oświadczenia współautorów w załączniku nr 7.

## 5) OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO/ARTYSTYCZNEGO WW. PRACY/PRAĆ I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

### 5.1 Wstęp

Enzootyczna białaczka bydła (EBL) jest zakaźną chorobą nowotworową w etiologii której zasadniczą rolę odgrywa retrowirus **BLV** (*Bovine Leukemia Virus*) z rodzaju *Deltaretroviridae*. Większość zakażonego bydła (w przybliżeniu 70%) to osobniki bez objawów klinicznych (tzw. aleukemiczne, AL), których stan infekcji można zdiagnozować jedynie serologicznie lub przez detekcję prowirusa metodami molekularnymi. U około 30% osobników rozwija się stadium podkliniczne choroby, objawiające się zmianami w profilu hematologicznym wskutek wzrostu liczby limfocytów B (tzw. osobniki z przewlekłą limfocytozą, PL). W okresie kilku lat u 1-5% osobników zakażonych BLV dochodzi do transformacji nowotworowej komórek zakażonych wirusem, co prowadzi do rozwoju białaczki (leukemii) lub mięsaka limfocytowego (limfosarcoma) objawiającego się występowaniem litych guzów w różnych częściach ciała, rozrost których prowadzi do śmierci zwierzęcia (za Aida i in. 2013). Początkowo EBL była chorobą endemiczną występującą w prowincji Prusy Wschodnie, obejmującej dzisiejsze tereny Litwy, Obwodu Kaliningradzkiego oraz Warmii i Mazur, jednak wskutek eksportu zakażonego bydła oraz masowych jego przerzutów w ramach reparacji po II wojnie światowej, została ona rozpleniona po całym świecie (za Grundboeck 1980). Wieloletnia, intensywna oraz kosztowna akcja eradykacyjna BLV na terenie Unii Europejskiej, polegająca na detekcji BLV-seropozytywnych osobników oraz poddaniu ich przymusowemu ubojowi, doprowadziła do likwidacji prawie wszystkich ognisk wirusa na terenie wspólnoty. Polska dzięki udziałowi w tym programie, decyzją Komisji Europejskiej z dnia 24 maja 2017 opublikowaną w Dzienniku Urzędowym UE nr 2017/888, uzyskała status kraju całkowicie wolnego od białaczki bydła. Sytuacja epidemiologiczna odnośnie występowania BLV wygląda zgoła odmiennie na terenie obu Ameryk, gdzie na początku XXI wieku ponad 80% stad bydła mlecznego w USA i Argentynie, było stadami seropozytywnymi z wysoką frekwencją osobników zakażonych wirusem BLV (za Juliarena i in. 2017). Dane z bazy OIE (International Organization of Epizootics) wskazują na występowanie dużych ognisk choroby na terenie Japonii, Tajwanu, Korei oraz Rosji i Ukrainy, z kolei brak jest danych z innych krajów np. z Chin. Pomimo pewnych niespójności w niektórych badaniach, przeważa pogląd, że krowy zakażone BLV charakteryzują się obniżoną wartością ekonomiczną, ze względu na większą podatność na choroby zakaźne, zmniejszoną wydajność, obniżoną reprodukcję i w konsekwencji częstszą konieczność uboju (za Juliarena i in. 2017). W samych tylko Stanach Zjednoczonych roczne straty ekonomiczne z powodu BLV szacowane są na 525 milionów dolarów (Bartlett i in. 2014). W krajach UE dodatkowe straty ekonomiczne są spowodowane ograniczeniami w handlu i kosztami eliminacji (European Food Safety Authority, AHAW Panel 2015).

W ostatnich latach największe kontrowersje budzi kwestia potencjału zoonotycznego BLV. Wirus białaczki bydła jest blisko spokrewniony z ludzkim wirusem białaczki HTLV-1 (*Human T-cell Leukemia Virus type 1*), który powoduje białaczkę T-komórkową u dorosłych (ATL *Adult T-cell Leukemia*) oraz zaburzenia neurozapalne ośrodkowego układu nerwowego. BLV i HTLV-1 charakteryzują się podobną

organizacją genomu, podobnymi mechanizmami jego ekspresji oraz podobieństwami w patogenezie i przebiegu wywoływanych chorób, pomimo że ww. wirusy zakażają inne typy limfocytów, odpowiednio B i T. Owce zakażone wirusem BLV są używane jako zwierzęta modelowe w badaniach nad patogenezą i terapią chorób powiązanych z HTLV-1 (za Gillet i in. 2007, za Aida i in. 2013). Przez dziesięciolecia dominował pogląd o nieszkodliwości BLV dla zdrowia człowieka. Powstał on w oparciu o badania epidemiologiczne, które nie wykazywały, że konsumpcja niepasteryzowanego mleka lub mięsa od krów zakażonych wirusem BLV wpływa na zwiększenie częstotliwości zapadania ludzi na białaczkę i inne nowotwory (za Gillet i in. 2007, Sellers i in. 2008). Nowe badania ujawniły jednak obecność wirusowego białka p24 w preparatach barwionych immunohistochemicznie oraz sekwencji prowirusowych BLV w próbkach pochodzących z guzów piersi u kobiet (Buehring i in. 2014), a następnie wykazano związek BLV z występowaniem nowotworów piersi w badaniach kliniczno-kontrolnych (Buehring i in. 2015). Powyższe wyniki nie znalazły potwierdzenia w analizach genomów komórek nowotworowych uzyskanych z sekwencjonowania następnej generacji (NGS), 51 guzów piersi, które zdeponowano w publicznej bazie NCBI. Żaden z 32 mld odczytów nie wykazywał homologii do sekwencji genomowej BLV (Gillet i Willems 2016). Pomimo braku rozstrzygających dowodów na patogenność BLV u ludzi, obecne obawy uzasadniają potrzebę wszechstronnych badań nad biologią BLV, w tym także nad molekularnym aspektem interakcji patogen-gospodarz.

Pomimo że w patogenezie enzoptycznej białaczki bydła kluczową rolę pełni wirus BLV, szerzenie się choroby i jej przebieg od zakażenia, poprzez rozwój przewlekłej limfocytozy aż do transformacji nowotworowej, uwarunkowane są czynnikami środowiskowymi (dominująca transmisja horyzontalna na drodze jatrogennej lub poprzez owady krwiopijne, Ooshiro i in. 2013) oraz predyspozycją genetyczną gospodarza (Glass i in. 2010). Pionierskie prace z lat sześćdziesiątych XX wieku wskazujące wpływ czynników genetycznych na rozwój choroby, oparte były na dwóch obserwacjach: 1) w stadach o wielkim nasileniu występowania białaczki choroba wykazywała tendencję do masowego pojawiania się w niektórych liniach genetycznych, podczas gdy w innych była spotykana rzadziej lub nienotowana w ogóle (Croshaw i in. 1963); 2) przy doświadczalnym zakażeniu zwierząt, mimo stosowania jednakowych dawek wirusa i utrzymywaniu zwierząt w podobnych warunkach, nie wszystkie osobniki chorowały (Bendixen 1965). Najnowsze badania oceniające wpływ czynników genetycznych na występowanie białaczki, wykonane na dużych populacjach bydła w Stanach Zjednoczonych, szacują odziedziczalność występowania zakażenia BLV na poziomie  $h^2=8\%$ , zarówno u bydła rasy holsztyńsko-fryzyjskiej jak i w rasie jersey (Abdalla i in. 2013, Abdalla i in. 2016). Analizując wpływ poszczególnych genów bydłowych na przebieg procesu leukemogenezy oraz zjawisko podatności/oporności na białaczkę bydła, nie można przeoczyć faktu, że pomimo wieloletnich poszukiwań różnych zespołów badawczych, dobrze udokumentowany w piśmiennictwie naukowym jest efekt tylko jednego genu. Antycypując rolę układu zgodności tkankowej w procesach immunologicznych związanych z rozpoznawaniem komórek zakażonych i niezakażonych wirusem BLV oraz stosując w badaniach markery serologiczne a później molekularne, zespół prof. Harrisa Lewina z amerykańskiego Uniwersytetu Illinois wykazał w serii prac, że podatność/oporność na rozwój przewlekłej limfocytozy jest związana z jednym z genów MHC klasy II oznaczonym jako BoLA-DRB3 (za Lewin 1994). Oporność warunkowana była obecnością motywu kwas glutaminowy-arginina (ER) w pozycji

70-71 łańcucha aminokwasów, wchodzącego w skład domeny wiążącej i prezentującej antygeny (Xu i in. 1993). W późniejszych pracach zespołu z Argentyny (Juliarena i in. 2008) dowiedziono, że jeden z alleli kodujących motyw ER oznaczony jako BoLA-DRB3.2\*0902 wykazywał statystycznie istotny związek z opornością na rozwój limfocytozy oraz z niskim mianem wirusa u zakażonych zwierząt (tzw. profilem LPL, *low proviral load*). Niedawno zademonstrowano, że zwierzęta charakteryzujące się profilem LPL oraz posiadające w swoim genotypie allel BoLA-DRB3.2\*0902 nie mogą być źródłem dalszej transmisji wirusa BLV w stadzie w warunkach hodowlanych (Juliarena i in. 2016). Brak negatywnego oddziaływania allelu BoLA-DRB3.2\*0902 na poziom użytkowości mlecznej oraz na poziom odpowiedzi immunologicznej przeciwko innym powszechnie spotykanym wirusom (BVDV, BHV-1, FMDV), umożliwił rozpoczęcie w Argentynie programu hodowlanego opartego o selekcję wspomaganą markerami (MAS), mającego na celu zmniejszenie liczby pogłowia zainfekowanego wirusem BLV (Esteban i in. 2009). Niemniej jednak zakres zmienności profilu LPL niezwiązany z korzystnym allelem BoLA-DRB3.2\*0902 (Esteban i in. 2009, Juliarena i in. 2017) sugeruje, że genetyczna oporność na BLV i przebieg choroby mogą być pod kontrolą wielu jeszcze nieznanym lub niezidentyfikowanym genów, z których każdy w niewielkim, ale istotnym stopniu przyczynia się do wykształcenia fenotypu oporności/podatności na BLV. Innym z genów rozpatrywanych w kontekście podatności/oporności na białaczkę bydła jest gen TNF- $\alpha$  kodujący czynnik martwicy nowotworu. Wykazano, że polimorfizm A/G w pozycji -824 domniemanego enhancera genu TNF- $\alpha$  u bydła przyczynia się do progresji choroby, zaś allel -824G związany jest z niską aktywnością transkrypcyjną (Konnai i in. 2006). Wynik ten jednakże nie został potwierdzony w badaniach, w których brałem udział (Bojarojć-Nosowicz i in. 2016), gdzie nie stwierdziliśmy wpływu tego polimorfizmu na poziom ekspresji TNF- $\alpha$  u krów zakażonych i niezakażonych wirusem BLV.

Wyniki wielu grup badawczych wskazują na wielofunkcyjne białko wirusowe Tax jako główny czynnik transformujący w patogenezie BLV (za Gillet i in. 2007). Transaktywator Tax bierze m.in. udział w regulacji transkrypcji genów komórkowych oraz moduluje aktywność wielu białek w komórce poprzez interakcje białko-białko, tworząc podstawę mechanizmu leukemogenezy (Klener i in. 2006). Wykonane z wykorzystaniem technologii mikromacierzy ekspresyjnych badania profili transkryptomicznych komórek owczej immortalizowanej linii Clone2 i owczych limfocytów B krwi obwodowej (Klener i in. 2006) oraz ludzkich komórek HeLa, (Arainga i in. 2012) transfekowanych konstruktem ekspresyjnym z sekwencją Tax BLV ujawniły, że w warunkach *in vitro* białko Tax jest bardzo wydajnym modulatorem transkrypcji genów gospodarza. Lista genów, których ekspresja na poziomie transkrypcji może być zmieniona jest bardzo bogata i obejmuje m.in. geny kodujące cytokiny, immunomodulatory, czynniki transkrypcyjne oraz białka związane z cyklem komórkowym, naprawą DNA, apoptozą a także cząsteczki sygnałowe i adhezyjne mogące wpływać na przebieg patogenezy BLV. Nie rozstrzygnięte pozostaje, czy podobne zmiany w ekspresji genów gospodarza występują *in vivo* podczas progresji EBL u naturalnie zakażonego bydła.

Wydaje się wysoce prawdopodobne, że o wyniku zakażenia i rozwoju infekcji BLV oraz późniejszej transformacji decyduje subtelna równowaga pomiędzy ekspresją genów BLV a skuteczną odpowiedzią immunologiczną gospodarza. Zaburzenia w odpowiedzi gospodarza indukowane przez wirusa lub uwarunkowane poprzez genotyp gospodarza tworzą molekularną scenierię, dzięki której wirus wymyka się kontroli immunologicznej i uruchamia mechanizmy leukemogenezy. Poszczególne elementy tej scenierii są

jeszcze stosunkowo słabo poznane. Rozwój metod z zakresu genomiki, którego świadkami byliśmy w ostatnim piętnastoleciu, niesie nadzieję na szybki postęp w identyfikacji genów związanych z patogenezą BLV, poznaniu funkcji kodowanych przez nie białek i zrozumieniu ich wzajemnych interakcji, co w przyszłości może zostać wykorzystane w nowych podejściach profilaktycznych bądź terapeutycznych. Ogólnym celem badań w ramach prezentowanego cyklu publikacji, przewidzianych jako szczególne osiągnięcie w procedurze habilitacyjnej, była identyfikacja nowych genów zaangażowanych w odpowiedź gospodarza na zakażenie wirusem BLV wytypowanych za pomocą metod genomiki funkcjonalnej i strukturalnej.

## 5.2 Omówienie wyników prac wskazanych jako szczególne osiągnięcie naukowe

### 5.2.1. Brym P., Ruś A., Kamiński S. 2013 *Evaluation of reference genes for qRT-PCR gene expression studies in whole blood samples from healthy and leukemia virus infected cattle* **Veterinary Immunology and Immunopathology 153: 302-307.**

#### Cel pracy i uzasadnienie badań

Celem pracy była identyfikacja i walidacja zestawu 10 genów referencyjnych wytypowanych do poprawnej normalizacji wyników qRT-PCR w leukocytach krwi krów zakażonych i niezakażonych wirusem BLV.

Wyniki porównań profili transkryptomycznych uzyskanych z wykorzystaniem technologii mikromacierzy ekspresyjnych lub metody RNA-seq powinny zostać potwierdzone dla wybranej grupy genów z wykorzystaniem innej techniki pomiaru poziomu ekspresji mRNA. Od wielu lat w tym celu wykorzystywana jest technika ilościowego RT-PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR), uważana za swoisty „złoty standard” w szacowaniu ilości poszczególnych transkryptów. Należy jednak podkreślić, że aby uzyskać wiarygodne wyniki oznaczeń ekspresji należy je prawidłowo znormalizować. Najbardziej powszechnym podejściem do normalizacji jest odniesienie poziomu mRNA genu będącego przedmiotem zainteresowania do poziomu mRNA endogennej kontroli wewnętrznej, określanej jako gen referencyjny, którego poziom ekspresji uważa się za stabilny we wszystkich badanych próbkach wchodzących w skład eksperymentu, niezależnie od rodzaju komórek i możliwego stanu choroby (Huggett i in. 2005). W piśmiennictwie naukowym pojawia się coraz więcej doniesień sugerujących, że nie istnieją uniwersalne geny referencyjne, a zastosowanie niewłaściwych genów referencyjnych do normalizacji, tzn. takich które są regulowane w kontekście konkretnego eksperymentu, prowadzi do błędnych wyników (Vandesompele i in. 2002, Andersen i in. 2004, Piehler i in. 2010, Ledderose i in. 2011). Ponadto wymóg zastosowania więcej niż jednego genu referencyjnego jest zawarty w wytycznych MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*, Bustin i in. 2009) w celu zmniejszenia relatywnie dużych błędów związanych z powszechną praktyką stosowania do normalizacji pojedynczego genu referencyjnego. Różne zestawy genów referencyjnych były wskazywane jako optymalne do normalizacji danych qRT-PCR w ludzkich leukocytach, w zależności od analizowanego procesu chorobowego, podtypów leukocytów, zastosowanych procedur aktywacji, metod sortowania komórek i użytego systemu do stabilizacji RNA



w próbkach krwi (Valceckiene i in. 2010, Piehler i in. 2010, Falkenberg i in. 2011, Ledderose i in. 2011). Ze względu na brak danych literaturowych wskazujących użyteczne geny referencyjne do normalizacji danych qRT-PCR w RNA z krwi bydłowej, szczególnie w kontekście nieprawidłowości limfoproliferacyjnych wywołanych przez BLV, zdecydowaliśmy się przeprowadzić systematyczne analizy stabilności ekspresji potencjalnych kandydatów w próbkach uzyskanych od zwierząt zdrowych i zainfekowanych wirusem BLV w stadium przewlekłej limfocytozy.

### **Materiał i metody**

Wykorzystane do badań próbki krwi pochodziły od zwierząt rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej utrzymywanych w trzech seropozytywnych stadach z różnych rejonów Polski. Diagnostyka EBL została przeprowadzona w oparciu o test ELISA POURQUIER® ELISA Bovine Leukosis Screening kit (Institute Pourquier) zgodnie z protokołem producenta. Dodatkowo wyniki zostały potwierdzone poprzez detekcję prowirusowego DNA z wykorzystaniem techniki nested-PCR (Markiewicz i in. 2003). Rutynowe parametry hematologiczne oznaczono za pomocą automatycznego analizatora hematologicznego Sysmex SF3000 zgodnie z instrukcjami producenta. W oparciu o wyniki oznaczeń serologicznych, molekularnych i hematologicznych, utworzono grupę eksperymentalną składającą się z 7 zwierząt wolnych od BLV z prawidłowymi wartościami wskaźników hematologicznych (średnia liczba limfocytów  $\times 10^3/\mu\text{l}$ ,  $3,28 \pm 1,02$ ) i 7 osobników zakażonych BLV z widocznymi zmianami hematologicznymi charakterystycznymi dla limfoproliferacyjnego stadium enzootycznej białaczki bydła (średnia liczba limfocytów  $\times 10^3/\mu\text{l}$ ,  $19,17 \pm 12,18$ ). RNA było izolowane z 3 ml krwi pobieranej do próbek VACUETTE® Tempus™ Blood RNA Tube (Applied Biosystems, Greiner Bio-One) zawierających roztwór stabilizujący RNA. Do izolacji wykorzystano zmodyfikowaną procedurę opartą o zestaw odczynnikowy PerfectPure™ RNA Cell & Tissue (5 PRIME). Ilość i jakość uzyskanych preparatów RNA weryfikowano spektrofotometrycznie oraz z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej. Wartości wskaźników jakości RNA nie różniły się statystycznie pomiędzy analizowanymi grupami, z wartościami  $RIN > 9$  i stosunkiem  $28S rRNA/18S rRNA > 1,7$  u wszystkich osobników objętych analizą. Odwrotną transkrypcję oraz wykonanie testów qRT-PCR przeprowadzono standardowymi technikami. Wykonano analizy dla 10 genów referencyjnych: ACTB, GAPDH, H3F3A, PPIA, RPLP0, TBP, HPRT1, POL2A, B2M i UCHL5, w wyborze których kierowano się danymi na podstawie dostępnego piśmiennictwa. W celu uniknięcia ewentualnej koregulacji pomiędzy genami, wszystkie analizowane geny z wyjątkiem POL2A i TBP kodowały białka należące do odrębnych klas funkcjonalnych. Specyficzność uzyskanych ampikonów weryfikowano poprzez ich sekwencjonowanie. Do oceny poziomu stabilności ekspresji wykorzystano komercyjny program qBase<sup>Plus</sup> (Hellemans i in. 2007) z zaimplementowanym algorytmem geNorm<sup>Plus</sup> oraz 2 makra w programie MS Excel: NormFinder (Andersen i in. 2004) i BestKeeper (Pffafel i in. 2004). Do wygenerowania ogólnego rankingu przydatności omawianych genów do normalizacji wyników qRT-PCR w kontekście infekcji BLV wykorzystano średnią geometryczną, z miejsc rankingowych zajmowanych przez geny w poszczególnych algorytmach.

## Rezultaty badań i ich interpretacja

Przy użyciu opartego na Excelu oprogramowania BestKeeper wyliczono szereg statystyk opisowych opartych o nieprzetworzone wartości Cq. Zgodnie z obserwowaną zmiennością, badane geny referencyjne można uporządkować od tych z najbardziej stabilną ekspresją, które charakteryzuje niska wartość odchylenia standardowego, do tych najmniej stabilnych wykazujących najwyższą zmienność (Pfaffl i in. 2004). Ranking według SD wskazuje, że geny o najbardziej stabilnej ekspresji to PPIA, RPLP0 i UCHL5, zaś największą zmiennością ekspresji charakteryzowały się geny GAPDH i ACTB.

NormFinder wykorzystuje podejście oparte na modelu statystycznym w celu oszacowania nie tylko całkowitej zmienności ekspresji kandydujących genów normalizacyjnych, ale także zmienności pomiędzy i w obrębie porównywanych grup. Kandydaci o najniższej zmienności międzygrupowej i wewnątrzgrupowej mają niższą wartość wyliczonego parametru S, i tym samym są wyżej klasyfikowani jako bardziej stabilni (Andersen i in. 2004). NormFinder zidentyfikował TBP jako najbardziej stabilny gen o wartości stabilności 0,093, a H3F3A, HPRT1 i UCHL5 jako następne w rankingu. Najmniej stabilnym kandydującym genem referencyjnym był ACTB o wartości stabilności 0,272. Biorąc pod uwagę zmienność wewnątrzgrupową i międzygrupową między grupami eksperymentalnymi, NormFinder wskazał również na RPLP0 i B2M jako najlepszą kombinację dwóch genów referencyjnych do normalizacji danych qRT-PCR w komórkach krwi pełnej o różnym statusie BLV. Wartość stabilności S dla RPLP0 i B2M łącznie wyniosła 0,035. Wskazuje to na znacznie bardziej niezawodną normalizację danych qRT-PCR przy użyciu dwóch mniej stabilnych genów referencyjnych niż normalizację opartą o pojedynczy najwyżej oceniony gen TBP.

Algorytm geNorm pozwala obliczyć wartość stabilności ekspresji M jako średnią zmienność ekspresji w parach poszczególnych genów w stosunku do pozostałych kombinacji objętych analizą. Niskie wartości M charakteryzują geny o najbardziej stabilnej ekspresji, stąd najbardziej odpowiednie do normalizacji (Vandesompele i in. 2002). Ranking genów według wzrastającej wartości M wskazuje, że UCHL5, RPLP0 i H3F3A są genami referencyjnymi o najbardziej stabilnej ekspresji. Podobnie, jak w przypadku analizy NormFinder i BestKeeper, wśród analizowanych zestawów genów najmniej stabilne były ACTB i GAPDH. Ponadto, algorytm geNorm<sup>PLUS</sup> pozwala również zanalizować minimalną liczbę genów referencyjnych wymaganych dla wiarygodnego współczynnika normalizacji. Wyniki uzyskane dla naszego zestawu genów kandydujących wskazują, że dwa geny o najniższych wartościach M, mianowicie UCHL5 i RPLP0 były wystarczające do prawidłowej normalizacji qRT-PCR.

Ogólny ranking oparty na średniej geometrycznej miejsc zajmowanych w rankingach każdej metody oddzielnie wykazał, że UCHL5, RPLP0 i TBP są najbardziej stabilnymi genami referencyjnymi spośród analizowanego zestawu. Warto zauważyć, że wszystkie trzy metody zgodnie wskazały, że powszechnie stosowane geny ACTB i GAPDH wykazują najmniejszą stabilność ekspresji. Obserwacja ta może mieć szczególne znaczenie, ponieważ do chwili obecnej większość danych qRT-PCR analizujących poziomy ekspresji genów u bydła zakażonego BLV, normalizowano z wykorzystaniem pojedynczych kontroli endogennych, którymi najczęściej były  $\beta$ -aktyna (ACTB) i dehydrogenaza 3-fosforanu gliceraldehydu (GAPDH), (Yakobson i in. 1998, Konnai i in. 2006, Ikebuchi i in. 2010, Shirai i in. 2011, Erskine i in. 2011). Nasze badania zatem stwarzają możliwość weryfikacji wcześniej uzyskanych wyników w celu podniesienia ich wiarygodności i dokładności.

**5.2.2. Brym P., Kamiński S. 2017 *Microarray analysis of differential gene expression profiles in blood cells of naturally BLV-infected and uninfected Holstein-Friesian cows. Molecular Biology Reports* 44:109–127.**

**Cel pracy i uzasadnienie badań**

Celem pracy było określenie zmian ekspresji genów w leukocytach krwi w odpowiedzi na infekcję wirusem białaczki bydła (BLV), prowadzące do wskazania genów biorących udział w procesach molekularnych prowadzących do przewlekłej limfocytozy (PL) oraz zaangażowanych w odpowiedź gospodarza na zakażenie.

Zmiany w profilu ekspresji genów mogą być przyczyną zróżnicowanej podatności/oporności bydła na BLV. Technologia mikromacierzy ekspresyjnych umożliwiającą równoczesną analizę znacznej części transkryptomu poszczególnych komórek pozwala na kompleksowy wgląd w złożone mechanizmy odpowiedzi immunologicznej i wskazanie sieci genów zaangażowanych w patogenezę choroby. To z kolei umożliwia lepsze zrozumienie mechanizmów molekularnych EBL, a w przyszłości być może, do opracowania strategii uniemożliwiającej wirusowi BLV „ucieczkę” przed mechanizmami obronnymi gospodarza. W odróżnieniu do wcześniej publikowanych profili transkryptomicznych, odnoszących się do patogenezы BLV, ale realizowanych na immortalizowanych owczych, bydłych bądź ludzkich liniach komórkowych lub na poddawanych hodowli *in vitro* bydłych komórkach PBMC (Klener i in. 2006, Everts i in. 2005, Arainga i in. 2012 oraz Van der Huevel i in. 2005) w naszych badaniach porównano profile transkryptomiczne leukocytów krwi pełnej, które natychmiast po wynacznieniu były lizowane i stabilizowane odczynnikami do stabilizacji RNA (Tempus™ Blood RNA Tube, Applied Biosystems). Pozwoliło to na otrzymanie wysokiej jakości preparatów RNA, nie różniących się pomiędzy badanymi grupami pod względem wskaźników jakościowych (RIN, 28S/18SrRNA) a także na zaobserwowanie zmiany ekspresji w bardziej fizjologicznym kontekście, gdzie ekspresja białek wirusowych BLV jest na bardzo niskim poziomie, w przeciwieństwie do warunków *in vitro*, gdzie ulega bardzo dużej aktywacji.

**Materiał i metody**

W badaniach wykorzystano próbki krwi pobrane w dwóch BLV-seropozytywnych stadach mlecznych, zlokalizowanych odpowiednio w północno-wschodniej i północno-zachodniej części Polski. Wszystkie zwierzęta od których pobierano materiał należały do rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej i były utrzymywane w zakażonym stadzie co najmniej 3 lata. Krew pobrano z żyły jarzmowej do podciśnieniowych probówek Vacuette® Serum, Vacuette® EDTA (Greiner Bio-One) and Vacuette® Tempus™ Blood RNA Tube (Applied Biosystems, Greiner Bio-One). Diagnostyka EBL, izolacja RNA oraz procedury kontroli jakości RNA zostały przeprowadzone analogicznie jak w pracy wcześniejszej (Brym i in. 2013). Grupa eksperymentalna składała się z 12 osobników zakażonych BLV z widocznymi zmianami hematologicznymi charakterystycznymi dla limfoproliferacyjnego stadium enzootycznej białaczki bydła (średnia liczba limfocytów  $\times 10^3/\mu\text{l}$ ,  $15,16 \pm 10,28$ ), a grupa kontrolna z 12 zwierząt wolnych od BLV z prawidłowymi wartościami wskaźników hematologicznych (średnia liczba limfocytów  $\times 10^3/\mu\text{l}$ ,  $3,43 \pm 1,22$ ).

W badaniach wykorzystano mikromacierze oligonukleotydowe Bovine Long Oligo Extension (BLOPlus), zawierające około 10K sond (platforma GEO: GPL9176), które zostały wyprodukowane i zakupione w *Center for Animal Functional Genomics, Michigan State University*. Do hybrydyzacji używano amplifikowanych liniowo aRNA wyznakowanych barwinkami fluorescencyjnymi Cy3/Cy5, przygotowanych z wykorzystaniem zestawu odczynnikowego Amino Alkyl MessageAmp<sup>TM</sup>II (Ambion, Life Technologies). Hybrydyzację prowadzono w oparciu o metodę wspólnej puli referencyjnej, którą uzyskano poprzez zmieszanie równych ilości całkowitego RNA ze wszystkich próbek objętych analizą, a potem użyto do przygotowania aRNA referencyjnego. Następnie aRNA uzyskane od każdego z 12 osobników zakażonych BLV+ oraz 12 osobników niezakażonych BLV- hybrydyzowano z aRNA puli referencyjnej na 24 mikromacierzach w automatycznej stacji do hybrydyzacji mikromacierzy wg zoptymalizowanego w badaniach wstępnych protokołu. Macierze były skanowane bezpośrednio po zakończeniu powyższego procesu za pomocą urządzenia ProScanArray i oprogramowania do akwizycji i analizy obrazu ScanArray Express (Perkin-Elmer). Do identyfikacji genów o zróżnicowanej ekspresji wykorzystano oprogramowanie LIMMA, (Smyth 2004). Normalizacja danych z mikromacierzy oparta była o metodę LOWESS (*locally weighted scatterplot smoothing*). Uzyskane wartości prawdopodobieństwa były korygowane poprawką na wielokrotne testowanie metodą FDR (Benjamini i Hochberg 1995). Geny różniące się ekspresją (DE) 1,5-krotnie ( $FC > 1,5$  i  $p \leq 0,01$  po poprawce FDR) zostały wykorzystane do metaanalizy danych w pakiecie bioinformatycznym GeneGO MetaCore<sup>TM</sup> (ver 5.3 GeneGo Thompson Reuters). W programie przeprowadzono analizy ontologiczne i klasyfikację białkowych produktów poszczególnych genów do określonych szlaków metabolicznych i ścieżek sygnałowych, analizowano obecność sieci genetycznych oraz możliwą koregulację w oparciu o udział określonych czynników transkrypcyjnych (algorytmy *Analyze Networks* i *AN Transcription Regulation*). Walidację wyników uzyskanych z mikromacierzy ekspresyjnych przeprowadzono dla 14 genów (8 down-regulowanych, 4 up-regulowanych i 2 niewykazujących różnic w ekspresji na mikromacierzach) z wykorzystaniem techniki qRT-PCR. Wyniki normalizowano z wykorzystaniem genów UCHL5 i RPLP0 wskazanych jako najbardziej stabilne geny referencyjne we wcześniejszej pracy (Brym i in. 2013). Do oszacowania różnic w poziomach ekspresji wykorzystano pakiet REST 2009 (*Relative Expression Software Tool*, Pfaffl i in. 2002).

### Rezultaty badań i ich interpretacja

Przyjmując arbitralnie próg 1,5-krotności w różnicach poziomu ekspresji (FC) jako istotny z biologicznego punktu widzenia oraz zakładając 1% fałszywie dodatnich wyników (po poprawce FDR), zaobserwowaliśmy różnice w ekspresji 370 genów. Z czego 212 genów charakteryzowało się obniżoną ekspresją ( $M \leq -0,582$ ) natomiast 158 genów posiadało wyższą ekspresję ( $M \geq 0,582$ ) u krów zakażonych BLV w porównaniu do grup krów zdrowych. Maksymalną wartość down-regulacji ( $FC = -3,21$ ) odnotowano dla dwóch genów: S100A4 (kodujący białko S100 wiążące wapń A4, dawniej określane terminem metastazy) oraz CFD (kodujący czynnik komplementu D zwany adipsyną). Z kolei genem o najwyższej up-regulacji ( $FC = 3,18$ ) w leukocytach osobników zakażonych BLV w porównaniu do osobników BLV- był gen ADRA2A kodujący adrenoceptor alfa 2A, członka nadrodziny receptorów sprzężonych z białkiem G. Przyjmując próg różnic w poziomach ekspresji genów na poziomach  $FC \geq 2$  i  $FC \geq 1,75$  przy wartości  $p \leq 0,01$ , byliśmy w stanie zidentyfikować odpowiednio 33 i 70 genów o podwyższonej ekspresji oraz prawie dwa razy więcej

o obniżonej ekspresji (odpowiednio 64 i 130) u bydła zakażonego BLV w porównaniu do grupy kontrolnej. Wartości te wskazują, że progresja enzootycznej białaczki do postaci podklinicznej zwanej przewlekłą limfocytozą związana jest głównie ze zmianami ekspresji na niskim (~ 1,5-krotnie) i średnim (≥1,75-krotnie) poziomie. Wyższa liczba genów o obniżonej niż podwyższonej ekspresji może być odzwierciedleniem pewnej immunosupresji, którą wirus BLV aktywuje, aby uniknąć odpowiedzi immunologicznej gospodarza. W pracy zamieszczono wykazy 25 genów up- i down-regulowanych o największej statystycznie istotności, zaś pełna lista genów o zróżnicowanej ekspresji znajduje się w materiałach uzupełniających dostępnych online. Wyniki szacowania poziomu ekspresji z wykorzystaniem mikromacierzy walidowano analizując poziom ekspresji dla 14 genów techniką qRT-PCR. Współczynnik korelacji dla różnic w krotności ekspresji szacowanych dwoma metodami wyniósł 0,98. Wysoka wartość współczynnika korelacji wskazuje, że pozostałe estymacje ekspresji genów na mikromacierzy są również prawidłowe. Analiza ontologiczna wykazała, że geny o zmienionej ekspresji pod wpływem zakażenia BLV powiązane są z szerokim spektrum procesów komórkowych m.in.: odpowiedzi immunologiczną, odpowiedzią na stres i zranienie, regulacją odpowiedzi immunologicznej, aktywacją komórek, odpowiedzią wrodzoną, apoptozą, regulacją metabolizmu, przekazywaniem sygnałów komórkowych, regulacją proliferacji i naprawą DNA. Bardziej skrupulatna analiza *GeneGo Process Networks Ontology* wskazała nadreprezentację genów o zróżnicowanej ekspresji zaburzających: cytotoksyczność komórek NK, układ dopełniacza, szlaki sygnałowe IL2, TREM-1 i białka C, adhezję i chemotaksję komórek, odpowiedź immunologiczną poszczególnych fagosomów oraz apoptozę i transdukcję sygnału TGF-β. Wśród funkcji molekularnych GO najliczniejszą kategorię stanowiło wiązanie z białkami, natomiast analiza *GO Localizations* wskazała na istotność regionu zewnątrzkomórkowego w patogenezie wywołanej przez BLV. Meta-analiza wiążąca geny o zróżnicowanej ekspresji z ich znanym udziałem w procesach chorobowych (*GeneGo Disease Biomarkers Ontology*) wykazała, że geny o obniżonej ekspresji u osobników BLV+ powiązane są z chorobami tkanki łącznej, chorobami autoimmunologicznymi, chorobami wirusowymi i białaczkami. Z kolei geny o podwyższonej ekspresji były związane z chłoniakami, innymi chorobami nowotworowymi oraz nieoczekiwanie z schizofrenią i zaburzeniami psychicznymi. Pomimo że w naszych porównaniach używaliśmy zwierząt w stadium limfocytozy, która jest uważana za stadium łagodne choroby, 87 genów z naszego zestawu DE było wymienione w kontekście białaczek, a jeszcze większa liczba genów była związana z biomarkerami transformacji nowotworowej różnych narządów. Sprzyja to sugestii, że deregulacja nie kilku, ale raczej wielu genów, tworzy transkrypcyjny fundament dla zdarzeń transformacyjnych indukowanych przez BLV. Ponadto obserwowana nadreprezentacja genów powiązanych z chorobami autoimmunologicznymi rzuca światło na nowy możliwy mechanizm odpowiadający za nieskuteczność odpowiedzi immunologicznej gospodarza przeciw BLV. W celu identyfikacji czynników transkrypcyjnych uczestniczących w regulacji powyższych genów zastosowano algorytm AN Transcription Regulation, który wskazał listę 30 czynników transkrypcyjnych potencjalnie zaangażowanych w powstanie obserwowanych różnic w poziomach transkryptów pomiędzy osobnikami zakażonymi BLV i niezakażonymi. Lista ta obejmuje m.in.: CREB1, c-MYC, SP1, NF-κB, GCR-alfa, c-JUN, ETS1, C/EBP, p53, STAT1, STAT3 i HIF1A. Trzy najczęściej powtarzające się czynniki: CREB1, c-MYC i SP1 regulują ponad 50% genów w naszym zbiorze danych DE. Szczególnie istotna wydaje się sieć genetyczna czynnika CREB1, który wpływa na poziom ekspresji 159 genów z listy DE. Obserwacja ta może być pośrednim



dowodem na fakt, że wirus BLV aktywnie moduluje poziom ekspresji genów gospodarza *in vivo*. Jest bowiem powszechnie wiadomym, że białko transaktywatora wirusowego Tax, uczestniczy w interakcjach o charakterze białko-białko właśnie z tym czynnikiem transkrypcyjnym wpływając na jego aktywność (za Gillet i in. 2007).

Uzyskane wyniki pozwalają na wskazanie nowych, wcześniej nie analizowanych w piśmiennictwie naukowym funkcjonalnych genów determinujących odpowiedź gospodarza na zakażenie BLV. Dwie grupy genów z uwagi na ich funkcjonalny efekt na zakażenie BLV i progresję enzootycznej białaczki wydają się szczególnie atrakcyjnym celem przyszłych badań. Pierwsza grupa zawiera geny odporności wrodzonej związane z aktywacją dopełniacza (C1qA, CFD), cytotoksycznością komórek NK i ścieżką sygnałową TREM-1 (TYROBP) oraz ubikwitynacją i degradacją białek odpornościowych (ITCH). Ich zaburzenia mogą być kluczowe w pierwszej fazie infekcji, gdzie niewielka liczba zakażonych BLV komórek albo wirusa w stanie wolnym dostaje się do organizmu i może zostać zneutralizowane przez te mechanizmy. Drugą grupę genów kandydujących zróżnicowanej odpowiedzi gospodarza tworzą geny odpowiedzialne za naprawę DNA i regulację cyklu komórkowego m.in. APEX1, MSH2, DCLRE1B, HIF1A, CEBRA, LMO2 i CDKN1A. Zaburzenia w ich działaniu prowadzą do niestabilności w genomie i akumulacji mutacji, co stanowi punkt wyjścia do transformacji nowotworowej.

**5.2.3 Brym P., Zabołewicz T., Kamiński S. 2018 *Differential expression of complement subcomponent C1qA in blood samples of healthy and BLV-infected Polish Holstein-Friesian cows. Animal Science Papers and Reports 36: 45-55.***

#### **Cel pracy i uzasadnienie badań**

Celem pracy było porównanie ekspresji genu C1qA na poziomie mRNA oraz białka w surowicy krwi, krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, naturalnie zakażonych i niezakażonych wirusem białaczki bydła (BLV), utrzymywanych w pojedynczym seropozytywnym stadzie.

Składowa dopełniacza C1q jest wielofunkcyjnym białkiem wiążącym szerokie spektrum ligandów, związanym m.in. z aktywacją klasycznej drogi układu dopełniacza, immunomodulacją, usuwaniem komórek apoptotycznych, mikroangiogenezą oraz rozwojem chorób o podłożu autoimmunologicznym (Kouser i in. 2015). Częsteczką C1q jest 18-peptydowym kompleksem zbudowanym z trzech typów łańcuchów kodowanych przez geny C1qA, C1qB oraz C1qC. Za główne źródło C1q w surowicy uważa się makrofagi, monocyty oraz komórki dendrytyczne. Porównanie profili transkryptomicznych krwi krów w podklinicznym stadium przewlekłej limfocytozy i niezakażonych wirusem białaczki bydła BLV (Brym i Kamiński 2017), wskazało na możliwy udział odpowiedzi nieswoistej, w tym komponentów dopełniacza w kształtowaniu naturalnej oporności na zakażenie. Przeprowadzona metaanaliza danych z mikromacierzy z wykorzystaniem metody GSE (*Gene Set Enrichment*) wykazała, że u osobników zainfekowanych BLV w stadium PL może dojść do zaburzeń w procesie aktywacji dopełniacza w związku z obniżoną ekspresją genu C1qA. Pomimo że obecnie nie wiadomo, czy bydłocy C1q jest w stanie wiązać się do jakiegokolwiek białka BLV, wyżej wymieniona obserwacja jest intrygująca biorąc pod uwagę fakt, że u ludzi C1q jest w stanie wiązać się z białkiem gp21 pokrewnego wirusa HTLV-1 hamując jego infekcyjność (Ikeda i in. 1998). W związku z powyższym zdecydowano się na kontynuację badań analizując poziom ekspresji mRNA C1qA

oraz jego związek z zawartością białka C1qA w surowicy krów niezainfekowanych i zainfekowanych BLV w stadiach z limfocytozą i u osobników aleukemicznych.

### **Materiał i metody**

Materiał badawczy w postaci próbek krwi pełnej oraz surowicy pochodził od zwierząt rasy polskiej holsztyńsko-fryzyskiej, utrzymywanych w pojedynczym seropozytywnym stadzie. Diagnostykę BLV przeprowadzono z wykorzystaniem metod molekularnych (detekcja prowirusowego DNA za pomocą techniki nested PCR) oraz serologicznych (test ELISA). Do zliczenia i różnicowania komórek krwi użyto automatycznego hematocytometru, przyjmując 10000 limfocytów za wartość progową, odróżniająca zwierzęta w fazie podklinicznej (przewlekła limfocytoza- PL) od zwierząt w fazie aleukemicznej (AL). Próbki RNA wyizolowano wg protokołu (Brym i Kamiński 2017). Zaprojektowano specyficzny i czuły test qRT-PCR do względnego oszacowania poziomu ekspresji mRNA C1qA, stosując jako gen referencyjny UCHL5, wytypowany jako najbardziej stabilny gen referencyjny z grupy 10 kandydatów (Brym i in. 2013). Ilość białka C1qA w surowicy badanych zwierząt została oszacowana za pomocą testu ELISA (Cusabio) zgodnie z protokołem producenta. Identyfikację polimorfizmu DNA w części promotorowej genu C1qA wykonano stosując technikę sekwencjonowania Sangera.

### **Rezultaty badań i ich interpretacja**

W badanym stadzie zidentyfikowano 8 krów w stadium PL, 15 zwierząt w stadium aleukemicznym oraz 13 niezakażonych wirusem BLV. Statystycznie istotne różnice w liczbie limfocytów, neutrofilów oraz granulocytów kwasochłonnych zaobserwowano pomiędzy zwierzętami o profilu PL a zwierzętami aleukemicznymi i zdrowymi. Z kolei różnica w ilości monocytów była statystycznie nieistotna. Zgodnie z oczekiwaniami nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w profilach hematologicznych między grupą zwierząt aleukemicznych a grupą zwierząt niezakażonych BLV. W porównaniu do zwierząt niezakażonych, ekspresja C1qA w leukocytach krwi obwodowej była obniżona 4,7-krotnie w grupie zwierząt PL oraz 1,7-krotnie w grupie zwierząt w stadium aleukemicznym. Średnia zawartość C1qA w surowicy wyniosła  $31,6 \pm 3,78$   $\mu\text{g/ml}$  w grupie PL oraz  $54,5 \pm 5,94$   $\mu\text{g/ml}$  w grupie niezakażonej ( $p \leq 0,05$ ). W grupie zwierząt aleukemicznych średnia zawartość C1q w surowicy wynosiła  $41,9 \pm 4,6$   $\mu\text{g/ml}$ . Obserwowane różnice w poziomach ekspresji mogą być spowodowane obecnością polimorfizmu DNA w rejonach regulacyjnych składowych C1q. Analiza 576 pz sekwencji 5'flankującej domniemane miejsce startu transkrypcji wykazała obecność 3 SNP. Z powodu stwierdzonej niskiej frekwencji rzadszych alleli, wpływu tych polimorfizmów na zróżnicowaną ekspresję C1qA nie można ani potwierdzić, ani wykluczyć. Ponadto, infekcja wirusem BLV i rozwój choroby może również wpływać na ekspresję C1qA. Mimo że udział układu dopełniacza w patogenezie związanej z zakażeniem wirusem białaczki bydła wymaga dalszych badań, doszliśmy do wniosku, że zróżnicowana ekspresja subkomponentu dopełniacza C1qA sugeruje, że bydłocy gen C1qA należy uznać za potencjalny gen kandydujący związany z opornością lub patogenezą BLV.

**5.2.4 Brym P.,** Bojarojć-Nosowicz B., Oleński K., Hering D.M., Ruś A., Kaczmarczyk E., Kamiński S. **2016** *Genome-wide association study for host response to bovine leukemia virus in Holstein cows. Veterinary Immunology and Immunopathology* **175: 24-35.**

### **Cel pracy i uzasadnienie badań**

Celem badania było analiza całego genomu bydła w celu zidentyfikowania markerów SNP i potencjalnych genów, które mogą być zaangażowane w odpowiedź gospodarza na zakażenie wirusem białaczki bydła.

Technologia BeadChip firmy Illumina umożliwia jednoczesną analizę tysięcy SNP rozproszonych wzdłuż całego genomu, co w połączeniu z podejściem statystycznym nazwanym ogólnogenomową analizą asocjacyjną (GWAS, *Genome-wide association studies*) zostało z powodzeniem zastosowane także w dziedzinie immunobiologii bydła (Casas i in. 2015, Lee i in. 2015). W pracy wykorzystano mikromacierz Illumina Bovine BeadChip 50K do zbadania całego genomu bydła w celu zidentyfikowania markerów i genów kandydujących, które mogą odgrywać rolę w zakażeniu BLV i mogą brać udział w zjawisku oporności/podatności na białaczkę bydła. Zgodnie z aktualną wiedzą, nasza praca jest jedną z dwóch publikacji, w których po raz pierwszy zastosowano podejście analizy asocjacji całego genomu do badania genetycznego podłoża odpowiedzi gospodarza na zakażenie BLV. Obie prace ukazały się w odstępie jednego miesiąca (Abdalla i in. 2016).

### **Materiał i metody**

Próbki krwi pobrano od krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej utrzymywanych w oborach o systemie wolnostanowiskowym, zlokalizowanych w różnych regionach Polski. Krew została pobrana z żyły szyjnej krów w okresie laktacji za pomocą zestawu do pobierania krwi Vacuette® i próbek próżniowych: Vacuette® Serum i Vacuette® EDTA (Greiner Bio-One). Rozpoznanie serologiczne enzoptycznej białaczki bydła przeprowadzono metodą ELISA przy użyciu Pourquier® ELISA Bovine Leukosis Screening (Institute Pourquier). Dodatkowo, wyniki potwierdzono za pomocą testu molekularnego opartego na detekcji prowirusowego DNA BLV przy użyciu techniki nested PCR (Markiewicz i in. 2003). Parametry hematologiczne oznaczono za pomocą zautomatyzowanego analizatora hematologicznego Sysmex SF3000 zgodnie z instrukcjami producenta. W oparciu o wyżej wymienione procedury diagnostyczne, utworzona grupa kliniczna (case) składała się z 43 osobników zakażonych BLV, ok. 5-letnich z widocznymi zmianami hematologicznymi charakterystycznymi dla stadium limfoproliferacyjnego EBL (średnia liczba krwinek białych  $\times 10^3/\mu\text{l}$ ,  $19,55 \pm 7,66$ ). Grupa kontrolna obejmowała 30 zwierząt niezakażonych BLV (podwójny negatywny wynik w testach serologicznych i molekularnych), w wieku ok. 5 lat, z normalnymi hematologicznymi wskaźnikami krwi (średnia liczba krwinek białych  $\times 10^3/\mu\text{l}$ ,  $7,52 \pm 1,24$ ). Zwierzęta z grupy kontrolnej były utrzymane co najmniej trzy lata w tych samych stadach seropozytywnych pod względem BLV, co ich odpowiedniki zakażone BLV. Genomowanie na mikromacierzy *Illumina Bovine 50K SNP BeadChip*, obejmujące 54 609 markerów SNP przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta (Infinium HD Assay, Illumina). Wstępna analiza jakości genotypowania została wykonana za pomocą GenomeStudio (wersja 2011.1, Illumina). Analizę GWAS przeprowadzono przy użyciu oprogramowania SVS (wersja 8.3.1 Golden Helix). W celu eliminacji fałszywie pozytywnych asocjacji wykonano korektę FDR. Procent wariancji powiązanej z efektem pojedynczego SNP był szacowany metodą EMMAX. Zastosowano dwa podejścia do identyfikacji potencjalnych genów kandydujących: podejście fizyczne i podejście funkcjonalne. Przy podejściu fizycznym zidentyfikowany marker ( $p < 0,00001$ ) znajdował się w obrębie lub najbliższym sąsiedztwie typowanego genu kandydującego. W podejściu funkcjonalnym zidentyfikowano geny kandydujące, sprawdzając odległość



około 1 mln pz wokół SNP, który wykazał statystycznie istotny efekt. Początkowa lista 373 genów kandydujących została zredukowana do 41 w oparciu o funkcje kodowanych białek i analizę ontologiczną przeprowadzoną z wykorzystaniem komercyjnego oprogramowania Pathway Studio (wersja 10.6.5.0 Elsevier), która w oparciu o metaanalizę danych zdeponowanych w bazach literaturowych, ułatwiła poszukiwania genów i białek potencjalnie zaangażowanych w patogenezę BLV.

### **Rezultaty badań i ich interpretacja**

Dla wszystkich genomowanych próbek DNA, pochodzących od 43 krów BLV+ oraz 30 krów kontrolnych BLV- uzyskano wskaźniki skuteczności genotypowania tzw. *call rate* >98%. Przyjęte kryteria selekcji SNP, zakładające eliminację z dalszej analizy markerów SNP, o słabej jakości genotypowania oraz z niską frekwencją rzadszego allelu ( $MAF > 0,05$ ) spowodowały, że do analizy GWAS ostatecznie wykorzystano 34297 SNP. Analiza GWAS wykazała statystycznie istotne asocjacje dla 9 markerów SNP ( $p < 0,00001$ ,  $q < 0,05$ ), zlokalizowanych na 6 autosomach. Siedem markerów SNP występowało w obrębie funkcjonalnych genów, natomiast dwa znajdowały się w rejonie intergenowym. Najbardziej znaczące asocjacje dotyczyły markerów: rs41583098 na BTA23; rs109405425 na BTA 3 oraz rs43564499 na BTA8, które występowały odpowiednio w genach PNPLA1, AP4B1 oraz CDCA2. Wszystkie trzy geny nie były dotychczas odnotowywane w literaturze w kontekście związków z przebiegiem enzootycznej białaczki bydła. Wiedza na temat ich funkcji w komórce jest stosunkowo ograniczona, ale pozwala uzasadnić tezę, że ich udział w patogenezie BLV jest możliwy. Konieczne są dalsze badania, potwierdzające związek ww. markerów z występowaniem choroby, przeprowadzone na innych populacjach zwierząt, a także poszukiwania w nich domniemanych mutacji o charakterze sprawczym. Możliwe jest także, że powyższe SNP są markerami genetycznymi dla sąsiadujących z nimi genów. SNP rs109405425 jest oddalony zaledwie o 3813 nukleotydów od genu DCLRE1B, kodującego białko uczestniczące w naprawie uszkodzeń DNA. Jest oczywiste, że nieprawidłowe funkcjonowanie takiego genu przyczynia się do niestabilności genomowego DNA i predysponuje do transformacji nowotworowej. W odległości 38 tys. pz od ww. markera znajduje się kolejny gen PTPN22 kodujący fosfatazę uczestniczącą w ścieżce sygnałowej receptorów BCR aktywującej proliferację limfocytów B, co także może mieć wpływ na progres choroby. Z kolei w odległości 300 tys. pz od markera rs41583098 znajduje się gen CDKN1A (p21) kodujący cyklino-zależną kinazę uczestniczącą w zatrzymaniu cyklu komórkowego w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Wpływ tego genu na występowanie białaczki u bydła potwierdzają wyniki analizy GWAS w populacji amerykańskich krów rasy HF (Abdalla i in. 2016) oraz wyniki metaanalizy danych z mikromacierzy ekspresyjnych (Brym i Kamiński 2017).

Konkludując, wykazano że odpowiedź gospodarza na zakażenie BLV obejmuje dziewięć segmentów genomu bydła (reprezentowanych przez 9 markerów SNP), zawierających wiele genów, których funkcje wskazują, że mogą one być zaangażowane w patogenezę enzootycznej białaczki bydła. Znalezione nową grupę obiecujących genów kandydujących (pozycyjnych) związanych z odpowiedzią gospodarza na zakażenie BLV, które mogą być celem przyszłych badań.

### 5.3 Podsumowanie

Celem prowadzonych badań w ramach cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej, których wyniki zaprezentowano powyżej było poszukiwanie i identyfikacja nowych genów zaangażowanych w determinację zróżnicowanej odpowiedzi bydła na infekcje wirusem białaczki BLV.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy habilitacyjnej zaliczam:

1. Wykazanie, że do poprawnej normalizacji wyników pomiaru ekspresji genów przeprowadzonych techniką ilościowego PCR w czasie rzeczywistym w leukocytach krwi krów zakażonych i niezakażonych BLV, wskazane jest użycie genów UCHL5 i RPLP0 jako genów referencyjnych
2. Potwierdzenie tezy, że patogenezę i progresję enzootycznej białaczki nie jest oparta na zaburzeniu pojedynczego szlaku komórkowego, a raczej jest wynikiem kompleksowej destabilizacji na wielu poziomach, która w efekcie końcowym może prowadzić do utraty kontroli nad proliferacją i apoptozą limfocytów B i ostatecznie do transformacji nowotworowej
3. Wykazanie, że wśród 370 genów o zróżnicowanej ekspresji pomiędzy osobnikami zakażonymi BLV i niezakażonymi, 159 genów powiązanych jest siecią genetyczną czynnika transkrypcyjnego CREB1, poprzez który wirus BLV może zmieniać poziomy ekspresji genów u bydła *in vivo*
4. Wskazanie na udział genu C1qA w procesach związanych z opornością lub patogenezą BLV
5. Wskazanie, poprzez całogenomową analizę asocjacyjną GWAS, 9 nowych segmentów DNA zawierających ponad 40 genów, których funkcja może tłumaczyć ich udział w patogenezie BLV
6. Podtrzymanie tezy o udziale genomicznych determinantów w zróżnicowanej odpowiedzi bydła na zakażenie wirusem BLV

### 5.4 Piśmiennictwo

- Abdalla EA, Rosa GJ, Weigel KA, Byrem T (2013) Genomic analysis of leukosis incidence in United States Holstein and Jersey populations. *J Dairy Sci* 96: 6022-6029
- Abdalla EA, Penagaricano F, Byrem T, Weigel KA, Rosa GJ (2016) Genome-wide association mapping and pathway analysis of leukosis incidence in a US Holstein cattle population. *Anim Genet* 47: 395-407
- Aida Y, Murakami H, Takahashi M, Takeshima S (2013) Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol* 4: article 328
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TB (2004). Normalization of real time quantitative reverse transcription PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64: 5245-5250
- Arainga M, Takeda E, Aida Y (2012). Identification of bovine leukemia virus Tax function associated with host cell transcription, signaling, stress response and immune response pathways by microarray-based gene expression analysis. *BMC Genomics* 13: 121
- Bartlett PC, Sordillo LM, Byrem TM, Norby B, Grooms DL, Swenson CL, Zalucha J, Erskine RJ (2014) Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 244(8): 914-922
- Bendixen HJ (1965) Bovine enzootic leukosis. *Adv Vet Sci* 10: 129-204
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate – a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 57: 289-300

- Bojarójc-Nosowicz B, Brym P, Kaczmarek E, Stachura A, Habel AK (2016) Polymorphism and expression of the tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene in non-infected cows and in cows naturally infected with the bovine leukaemia virus (BLV). *Veterinari Medicina* 61(1): 1-9
- Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Choi KY, Sun D, Nuovo G (2014) Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerg Infect Dis* 20(5):772-782
- Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Jin DL, Hudes M, Block G (2015) Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer :a case-control study. *PLoS One* 10(9):e0134304
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* 55: 611-622
- Casas E, Hessman BE, Keele JW, Ridpath JF (2015) A genome-wide association study for the incidence of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in cattle. *Anim Genet* 46 (1): 8-15
- Croshaw JE, Abt DA, Marshak RR, Hare WC, Switzer J, Ipsen J, Dutcher RM (1963) Pedigree studies in bovine lymphosarcoma. *Ann N Y Acad Sci* 108: 1193-1202
- Esteban EN, Poli M, Poiesz B, Ceriani C, Dube S, Gutierrez S, Dolcini G, Gagliardi R, Perez, S, Lützelshwab C, Feldman L, Juliarena MA (2009) Bovine leukemia virus (BLV), proposed control and eradication programs by marker assisted breeding of genetically resistant cattle. In Rechi LJ (Eds) *Animal Genetics*, Nova Science Publishers, Inc: Hauppauge, NY, USA, chapter 6, pp 107-130
- European Food Safety Authority AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare), (2015) Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. *EFSA Journal* 13(7): 4188-4251.
- Erskine RJ, Corl ChM, Gandy JC, Sordillo LM (2011) Effect of infection with bovine leukosis virus on lymphocyte proliferation and apoptosis in dairy cattle. *Am J Vet Res* 72: 1059-1064
- Everts RE, Band MR, Liu ZL, Kumar CG, Liu L, Loor JJ, Oliveira R, Lewin HA (2005) A 7872 cDNA microarray and its use in bovine functional genomics. *Vet Immunol Immunopathol* 105: 235-245
- Falkenberg VR, Whistler T, Murray JR, Unger ER, Rajeevan MS (2011) Identification of Phosphoglycerate Kinase 1 (PGK1) as a reference gene for quantitative gene expression measurements in human blood RNA. *BMC Res. Notes.* 4: 324
- Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar AB, Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R, Willems L (2007) Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 4: 18
- Gillet NA, Willems L (2016) Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. *Retrovirology* 13:75
- Glass EJ, Baxter R, Leach R, Taylor G (2010) Bovine viral diseases: The role of host genetics. In Bishop SC, Axford RFE, Owen J, Nicholas F (ed) *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*, 3rd edn. CAB International Oxfordshire, UK, chapter 6, pp 88-140
- Grundboeck M (1980) Rozpoznawanie i zwalczanie enzootycznej białaczki bydła. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, Research 19
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes Immun* 6: 279-284
- Ikebuchi R, Konnai S, Sunden Y, Onuma M, Ohashi K (2010) Molecular cloning and expression analysis of bovine programmed death-1. *Microbiol Immunol* 54: 291-298.

- Ikeda F, Haraguchi Y, Jinno A, Iino Y, Morishita Y, Shiraki H, Hoshino H (1998) Human complement component C1q inhibits the infectivity of cell-free HTLV-I. *J Immunol* 161: 5712-5719
- Ishiguro N, Furuoka H, Matsui T, Horiuchi M, Shinagawa M, Asahina M, Okada K p53 mutation as a potential cellular factor for tumor development in enzootic bovine leukosis. *Vet Immunol Immunopathol* 55: 351-358
- Juliarena MA, Barrios CN, Ceriani MC, Esteban EN (2016) Hot topic: bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *J Dairy Sci* 99(6): 4586–4589
- Juliarena MA, Barrios CN, Lützel Schwab CM, Esteban EN, Gutierrez SE (2017) Bovine leukemia virus: current perspectives. *Vir Adapt and Treat* 9: 13-26
- Juliarena MA, Poli M, Sala L, Ceriani C, Gutierrez S, Dolcini G, Rodriguez EM, Marino B, Rodriguez-Dubra C, Esteban EN (2008) Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Anim. Genet.* 39: 432–438
- Klener P, Szynal M, Cleuter Y, Merimi M, Duvillier H, Lallemand F, Bagnis C, Griebel P, Sotiriou C, Burny A, Martiat P, Van den Broeke A (2006) Insights into gene expression changes impacting B-cell transformation: cross-species microarray analysis of bovine leukemia virus tax-responsive genes in ovine B cells. *J Virol* 80: 1922-1938
- Konnai S, Usui T, Ikeda M, Kohara J, Hirata T, Okada K, Ohashi K, Onuma M (2006) Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. *Microbes Infect* 8: 2163-2171.
- Kouser L, Madhukaran S., Shastri A, Saraon A, Ferluga J, Al-Mozaini M, Kishore U (2015) Emerging and novel functions of complement protein C1q. *Front in Immunol.* 6:317
- Ledderose C, Heyn J, Limbeck E, Kreth S (2011) Selection of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in human T cells and neutrophils. *BMC Res. Notes* 4:427
- Lee BY, Lee KN, Lee T, Park JH, Kim SM, Lee HS, Chung DS, Shim HS, Lee HK, Kim H (2015) Bovine Genome-wide Association Study for Genetic Elements to Resist the Infection of Foot-and-mouth Disease in the Field. *Asian-Australas J Anim Sci* 28 (2): 166-170
- Lewin HA (1994) Host genetic mechanism of resistance and susceptibility to a bovine retroviral infection. *Anim Biotech* 5: 183-191
- Markiewicz L, Rułka J, Kamiński S (2003) Detection of BLV provirus in different cells by nested PCR. *Bull Vet Inst Pulawy* 47: 325-331
- Ooshiro M, Konnai S, Katagiri Y, Afuso M, Arakaki N, Tsuha O, Murata S, Ohashi K (2013) Horizontal transmission of bovine leukosis virus from lymphocytotic cattle and beneficial effect of insect vector control. *Vet Record* 173: 527
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet Ch, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26: 509-515
- Piehler AP, Grimholt RM, Ovstebø R, Berg JP (2010) Gene expression results in lipopolysaccharide-stimulated monocytes depend significantly on the choice of reference genes. *BMC Immunol* 11: 21
- Sellers TA, Vierant RA, Djeu J, Celis E, Wang AH, Kumar N., Cerhan JR (2008) Unpasteurized milk consumption and subsequent risk of cancer. *Cancer Causes Control* 19: 805-811
- Shirai T, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Suzuki S, Sunden Y, Onuma M, Murata S, Ohashi K (2011) Molecular cloning of bovine lymphocyte activation gene-3 and its expression characteristics in bovine leukemia virus-infected cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 144: 462-467
- Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3: article 3

- Van den Heuvel MJ, Jefferson BJ, Jacobs RM (2005) Purified bovine plasma blocking factor decreases Bovine leukemia virus p24 expression while increasing protein synthesis and transcriptional activity of peripheral blood mononuclear cells in short-term culture. *Can J Vet Res* 69: 186-192
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, research 0034.
- Valceckiene V, Kontenyte R, Jakubauskas A, Griskevicius L (2010) Selection of reference genes for quantitative polymerase chain reaction studies in purified B cells from B cell chronic lymphocytic leukaemia patients. *Br J Haematol* 151: 232-238
- Xu A, van Eijk MJ, Park Ch, Lewin HA (1993) Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J Immunol* 151: 6977-6985
- Yakobson B, Brenner J, Ungar-Waron H, Trainin Z (1998) Short-termed expression of interleukin-2 during experimental BLV infection may direct disease progression to persistent lymphocytosis. *Vet Immunol Immunopathol* 64: 207-218

## 6) OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Po ukończeniu studiów rozpocząłem pracę naukowo-dydaktyczną w Katedrze Genetyki Zwierząt, Wydziału Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, początkowo w charakterze doktoranta, a następnie nauczyciela akademickiego. Moje zainteresowania naukowe koncentrują się wokół badań nad genetycznym uwarunkowaniem cech produkcyjnych zwierząt gospodarskich, przede wszystkim bydła i trzody chlewnej. Wyniki realizowanych projektów badawczych, niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego, o którym mowa jest w punkcie 4, zostały opublikowane w 24 oryginalnych pracach twórczych, których jestem współautorem. Można je zakwalifikować do 6 głównych nurtów badawczych.

### 6.1 Poszukiwanie mutacji oraz analiza genów związanych z biosyntezą białek mleka, cechami użytkowości mlecznej oraz liczbą komórek somatycznych w mleku u bydła (publikacje: A4, A5, A6, A7, A9, A10, A12, A20, A21, A26 oraz komunikaty: P3, P4, P5, P6, P8, P10, P12)

Celem badań w obrębie tego nurtu była identyfikacja polimorfizmu DNA oraz analiza jego ewentualnego związku z fenotypowym zróżnicowaniem w zakresie cech użytkowości mlecznej oraz w poziomie zdrowotności wymienia krów. Omawiane prace w większości reprezentują klasyczną strategię genów kandydujących, wybieranych do analiz w oparciu o funkcję kodowanych białek i ich udział w badanych procesach fizjologicznych. Przysadkowy hormon prolaktyna oraz białka jej ścieżki sygnałowej tj. receptor prolaktyny i wtórny przekaźnik oraz czynnik transkrypcyjny STAT5A, regulują procesy mammogenezy, laktogenezy oraz ekspresji białek mleka u ssaków. Za pomocą technik PCR-SSCP oraz sekwencjonowania metodą Sangera, zidentyfikowałem 8 mutacji o charakterze SNP w genach PRL (prolaktyny), PRLR (receptora prolaktyny) oraz STAT5A bydła ras mlecznych (Brym i in. 2004, Brym i in. 2005a, Brym i in. 2005b). Siedem z wykrytych polimorfizmów DNA nie było opisanych wcześniej

w piśmiennictwie naukowym oraz w bazach danych, natomiast polimorfizm A/C w intronie 9 genu PRLR był pierwszym polimorfizmem zidentyfikowanym i opisanym w tym genie. Pomimo tego, że zidentyfikowane polimorfizmy były mutacjami cichymi albo występowały w intronach, to były one wykorzystywane jako markery genetyczne w licznych badaniach asocjacyjnych i populacyjnych prowadzonych przez różne zespoły badawcze w wielu rasach bydła. Fakt ten spowodował, że publikacje opisujące ww. polimorfizmy DNA zaliczają się do grona moich najczęściej cytowanych prac. Innym interesującym polimorfizmem, który zidentyfikowałem jako pierwszy, była substytucja A/G w pozycji -1043 sekwencji 5' regulatorowej genu prolaktyny opisywanej jako enhancer. Wykazałem, że osobniki o genotypie AA mają wyższy poziom ekspresji mRNA prolaktyny w przysadce mózgowej w porównaniu do osobników o genotypie GG. Jednocześnie powyższy polimorfizm różnicował wiązanie białek jądrowych z komórek przysadki, co wykazano za pomocą techniki EMSA. Wariant sekwencji z G wiązał większe ilości przysadkowych białek jądrowych, w szczególności czynników transkrypcyjnych Pit1, Oct1 oraz YY1, powodując inhibicję ekspresji prolaktyny (Brym i in. 2007). Inne publikacje z tego obszaru badawczego są związane z moją pracą w zespole prof. dr hab. S. Kamińskiego, który prowadził pionierskie badania z zakresu genomiki strukturalnej bydła z wykorzystaniem opracowanej w Katedrze Genetyki Zwierząt mikromacierzy do genotypowania SNP w technologii APEX, nazwanej MilkProtChipem. Wersja mini tej mikromacierzy ograniczona do genotypowania 16 starannie wyselekcjonowanych polimorfizmów DNA, została wykorzystana do badań asocjacyjnych z wynikami oceny użytkowości mlecznej 400 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyskiej, odmiany czarno-białej. Uzyskane wyniki opublikowane w *Animal Biotechnology* (Kamiński i in. 2006) potwierdzały wpływ znanych w piśmiennictwie mutacji K232A w genie DGAT1 (kodującym acylo-transferazę diacyloglicerolową), T297Y w genie GHR (kodującym receptor hormonu wzrostu) oraz D148A w genie CSN3 (kodującym kappa kazeinę mleka) na poziom cech użytkowości mlecznej, w szczególności na wydajność tłuszczu. Nowością w badaniach był wykryty związek pomiędzy polimorfizmem w genie LTF (kodującym laktoferynę), a wydajnością białka w mleku (wyższą wydajnością białka charakteryzowały się krowy o genotypie CC genu LTF). W powyższych badaniach byłem odpowiedzialny za przeprowadzenie badań asocjacyjnych wraz z analizą statystyczną. Z uwagi na fakt, że wykorzystano do genotypowania na mikromacierzy LTF polimorfizm był jednym z wielu znanych polimorfizmów w części 5' genu, badania kontynuowano z wykorzystaniem innego markera G/C w pozycji +32 sekwencji 5'UTR (Kamiński i in. 2006a, Kamiński et al. 2006b). Uzyskane wyniki również potwierdziły wpływ genotypu LTF na wydajność białka oraz dodatkowo zwróciły naszą uwagę na fakt, że osobniki o genotypie CC miały niższą zawartością komórek somatycznych w mleku. W dalszych badaniach z tego cyklu skupiliśmy się na polimorfizmie A/C genu LTF w pozycji -28 w obrębie sekwencji TATA box. Brałem udział w opracowaniu metodyki genotypowania tego polimorfizmu DNA za pomocą techniki PCR-SSCP, a także przeprowadziłem analizy EMSA wykazujące zróżnicowane wiązanie białek jądrowych z komórek gruczołu mlekowego do poszczególnych wariantów sekwencji. Sekwencja z adeniną była silniej wiązana przez ekstrakt białek jądrowych gruczołu mlekowego, zaś reakcje kompetycji wskazywały na istotny udział w tym procesie czynnika transkrypcyjnego GATA. Badania wykazały, że allel C występuje istotnie częściej u krów charakteryzujących się mniejszą liczbą komórek somatycznych w mleku ( $p < 0.0001$ ). Dodatkowo allel C nie wykazał negatywnego związku z wartościami hodowlanymi dla 29 cech użytkowości rutynowo analizowanych podczas oceny buhajów (Zabolewicz i in. 2012), co sugeruje jego potencjalne zastosowanie



w programach hodowlanych, nakierowanych na zmniejszenie częstotliwości chorób wymienia takich jak *mastitis*, które są w zależności przyczynowo-skutkowej do liczby komórek somatycznych w mleku. Dalsze prace wykazały, że polimorfizm -28 A/C wpływa na zawartość laktoferyny w mleku w zależności od stanu zdrowia wymienia (Zabolewicz i in. 2014). W grupie zwierząt zdrowych (<180000 komórek/ml), zwierzęta o genotypie AA charakteryzowały się dwukrotnie większą zawartością laktoferyny w mleku ( $107,58 \pm 17,92$   $\mu\text{g/ml}$ ) w porównaniu do krów o genotypie CC ( $52,09 \pm 19,01$   $\mu\text{g/ml}$ ). Zachodzące w wymieniu procesy zapalne, objawiające się zwiększeniem liczby komórek somatycznych (>350000 komórek/ml) powodowały odwrócenie zależności. Wyższą zawartością laktoferyny w mleku charakteryzowały się zwierzęta o genotypie CC ( $207,21 \pm 28,5$   $\mu\text{g/ml}$ ) w porównaniu do zwierząt o genotypie AA ( $115,0 \pm 28,6$   $\mu\text{g/ml}$ ). Przepuszczalnie promotor z cytozyną nie jest rozpoznawany jako klasyczna sekwencja TATA boku w komórkach epitelialnych zdrowego wymienia, natomiast procesy zapalne powodują jego aktywację poprzez inne czynniki transkrypcyjne niż GATA, na co wskazują analizy wiązania czynników transkrypcyjnych *in silico*. Ostatnia praca w tym nurcie badawczym w swojej genezie wywodzi się z nowego podejścia do genów kandydujących tzw. *positional candidate genes*, które typujemy w oparciu o zastosowanie mikromacierzy Illumina Bovine 50K SNP BeadChip oraz analizy GWAS. Wykonywane w Katedrze Genetyki Zwierząt oznaczenia na potrzeby szacowania genomowej wartości hodowlanej (EBV) buhajów użytkowanych w Polsce, pozwoliły na zaobserwowanie związku jednego z testowanych SNP z liczbą komórek somatycznych. Omawiany SNP występuje w sekwencji intergenowej w sąsiedztwie m.in. dwóch genów: ADAM32 i ADAM9 kodujących przedstawicieli metaloproteinaz z rodziny tzw. adamalizin. W badaniach wstępnych udało mi się zidentyfikować polimorfizm DNA w sekwencji 5' regulatorowej genu ADAM32 w postaci 7 SNP oraz mutacji typu indel 21 pz. Wymieniony polimorfizm insercyjno-delecyjny został wykorzystany do badań asocjacyjnych wykonanych z moim udziałem (Zabolewicz i in. 2017). Zwierzęta o genotypie Del/Del charakteryzowały się wyższą liczbą komórek somatycznych w mleku w porównaniu do grupy Ins/Ins ( $p=0,013$ ). Z uwagi na niejasną w chwili obecnej rolę białka ADAM32 w patogenezie schorzeń gruczołu mlekowego, wykonałem badania potwierdzające ekspresję genu ADAM32 w leukocytach krwi obwodowej oraz komórkach nabłonka wydzielniczego wymienia. Wyniki wskazują na możliwy udział kodowanego białka w procesach immunologicznych. Badania zmierzające do wykrycia ewentualnego polimorfizmu w sekwencji kodującej genu ADAM32 oraz kolejne badania asocjacyjne z zidentyfikowanym przeze mnie polimorfizmem typu *missense* w genie ADAM9 są w trakcie realizacji.

## **6.2 Analiza genów związanych z cechami produkcyjnymi oraz jakością mięsa u trzody chlewnej (publikacje: A1, A2, A3, A8, A14, A15, A17, A18, A19)**

W trakcie mojej pracy w Katedrze Genetyki Zwierząt UMW w Olsztynie byłem zaangażowany w badania, których wspólnym celem była analiza występowania polimorfizmu DNA w genomach świń różnych ras hodowanych w Polsce oraz ocena jego wpływu na wartość cech tucznych, rzeźnych oraz jakość wieprzowiny. Pierwsze prace były skupione na analizie interakcji z cechami użytkowości mięsnej oraz na badaniu zmian we frekwencji alleli w genie RYR1, w którym mutacja R615C powodowała podatność świń na stres oraz występowanie mięsa typu PSE. Badania były związane z komercyjnymi testami, które

wykonywano w Katedrze Genetyki Zwierząt, z uwagi na zalecaną przez ówczesne Ministerstwo Rolnictwa eliminację nosicieli allelu podatności świń na stres z hodowli w Polsce. Mój wkład w te prace ograniczał się do współdziałania w genotypowaniu osobników z wykorzystaniem metody PCR-RFLP oraz do analiz statystycznych (Kamiński i in. 2002a i Kamiński i in., 2002b). Następnie byłem wykonawcą w granicy zamawianym KBN: *Mikromacierz DNA do wykrywania polimorfizmu (SNPs) genów zaangażowanych w kształtowanie cech użytkowości mięsnej i rzeźnej świń oraz przydatności technologicznej wieprzowiny*, którego kierownikiem był prof. dr hab. S. Kamiński, a finalnym efektem opracowana mikromacierz umożliwiająca genotypowanie 85 SNP jednocześnie, nazwana SNI-PORK. Byłem aktywnie zaangażowany w konstrukcję tej mikromacierzy tworząc bazę danych ówczesnie znanych świńskich SNP, która następnie posłużyła do ich wytypowania oraz do zaprojektowania oligonukleotydów do genotypowania, nadrukowanych na mikromacierzy (Brym i Kamiński 2006, Kamiński i in. 2008). Mikromacierz SNI-PORK została użyta do genotypowania tuczników ekstremalnie różniących się pod względem potencjału glikolitycznego oraz poziomu wycieku w mięsie w badaniach zrealizowanych we współpracy z zespołem prof. dr hab. M. Koćwin-Podsiadłej (Kamiński i in. 2010). Badania wykazały wpływ polimorfizmu V54L w genie *DECR1* (kodującym 2,4 dienylo-redukatazę CoA) na wartość potencjału glikolitycznego mięsa, z kolei polimorfizm A/C w miejscu spicingowym genu *CYP21* (kodującym 21-hydroksylazę steroidową) różnicował zwierzęta pod względem wycieku. Mikromacierz SNI-PORK została wykorzystana do genotypowania 312 knurków ras PBZ i WBP oraz do późniejszych analiz asocjacyjnych z tempem przyrostów oraz mięsnością tusz (Brym i in. 2011). Wśród 60 analizowanych SNP, 14 wykazało związek z fenotypowym zróżnicowaniem w zakresie przynajmniej jednej z badanych cech. Polimorfizm T/C w promotorze genu *MYF6* (kodującym herkulinę) oraz mutacje V54L w genie *DECR1* i R728S w genie *CAST* (kodującym kalpastatynę) wysoko istotnie wpływały na tempo przyrostów dziennych, zaś polimorfizm R76P w genie czynnika transkrypcyjnego *MYOD1* wpływał najbardziej istotnie na poziom mięsności tusz ( $p < 0,0004$ ).

### **6.3 Perspektywy wykorzystania mikromacierzy SNP w selekcji zwierząt, kontroli pochodzenia, identyfikacji osobniczej produktów pochodzenia zwierzęcego oraz w diagnostyce weterynaryjnej (publikacje: A11, A16, RM1)**

Celem prac było potwierdzenie przydatności opracowanych mikromacierzy MilkProtChip (Kamiński i in. 2006) oraz SNI-PORK (Kamiński i in. 2009), jako narzędzi o dużym potencjale aplikacyjnym w hodowli zwierząt i analizie genetycznej. W publikacjach przedstawiono pogląd, że opracowane mikromacierze SNP mogły znaleźć zastosowanie w badaniach naukowych, selekcji bydła i świń, identyfikacji nosicieli chorób genetycznych oraz do kontroli pochodzenia i identyfikacji osobniczej. Wykazaliśmy, że stosunkowo mała informatywność biallelicznego SNP mogła być łatwo skompensowana poprzez zwiększenie liczby analizowanych SNPs u pojedynczego osobnika. Zestawy 30-40 SNP z tych mikromacierzy umożliwiały wykluczenie domniemanego rodzica na poziomie prawdopodobieństwa oferowanym przez dedykowane do tych celów zestawy od 7 do 10 markerów typu STR. Należy podkreślić, że prace z tego nurtu były stosunkowo pionierskie, ponieważ w tym czasie jedynie kilka zespołów na świecie pracowało nad zestawami SNP do genetycznej identyfikacji tożsamości oraz nad technikami do ich



skutecznego genotypowania. Gwałtowny rozwój komercyjnych platform genotypujących takich jak mikromacierze BeadChip firmy Illumina, który nastąpił w ostatnich latach spowodował jednak, że dalsze prace nad rozwojem mikromacierzy MilkProtChip i SNIPOK zostały zaniechane, ze względu na wykorzystanie mikromacierzy Illumina, jako standardowej metody w laboratoriach biorących udział w ocenie genomowej.

#### **6.4 Badania nad polimorfizmem oraz ekspresją genów czynnika martwicy nowotworu $\alpha$ oraz jego receptora u krów zakażonych i niezakażonych wirusem białaczki bydła (publikacje: A23, A24 oraz komunikaty: P12, P13)**

W obu publikacjach wiodącym autorem była dr B. Bojarojć-Nosowicz, zaś wykonane badania wynikały z realizacji grantu KBN, którego była kierownikiem. Celem badań była weryfikacja hipotezy o możliwym wpływie polimorfizmów w sekwencjach regulacyjnych genów TNF (-824 A/G) i TNFR11 (A/C w pozycji 16534) na poziom ich ekspresji w leukocytach krów zakażonych i niezakażonych wirusem BLV. Mój udział w badaniach polegał na zaprojektowaniu testów qRT-PCR oraz przeprowadzeniu analizy ekspresji na poziomie mRNA. W obu pracach nie udało się zaobserwować różnic w poziomach ekspresji badanych genów w zależności od genotypu. Wpływ wyżej wymienionych polimorfizmów na poziom ekspresji genów TNF i jego receptora należy uznać za nieistotny.

#### **6.5 Genetyczne uwarunkowanie żółtego zabarwienia tłuszczu u królików (publikacja A22)**

Celem badań jest ustalenie genetycznego podłoża żółtego zabarwienia tłuszczu u królików. Pomysłodawcą badań był dr J. Strychalski z Katedry Hodowli Zwierząt Futerkowych i Łowiectwa UWM w Olsztynie, który zaprosił mnie do współpracy w zakresie analiz molekularnych. Stosując sekwencjonowanie próbek cDNA genu BCO2 (kodującego 9'10' oksygenazę  $\beta$ -karotenu) uzyskanych z wątrób królików różniących się kolorem tłuszczu, zidentyfikowaliśmy pojedynczą mutację w postaci delekcji AAT w ramce odczytu, co powoduje delekcję asparaginy w pozycji 248 kodowanego białka BCO2. Następnie opracowałem test typu PCR-RFLP, umożliwiający przyżyciowe genotypowanie tego polimorfizmu z próbek genomowego DNA (Strychalski i in. 2015). Króliki o żółtym zabarwieniu tłuszczu są homozygotami recesywnymi Del/Del. Kolejne prace z tego obszaru badań dotyczące wpływu genotypu BCO2 na zawartość karotenoidów, retinolu i  $\alpha$ -tokoferolu w wątrobie i tłuszczu królików oraz wpływu genotypu BCO2 na zawartość karotenoidów, retinolu i  $\alpha$ -tokoferolu w mleku i odchów osesków są w trakcie recenzji w czasopiśmie z listy JCR.

#### **6.6 Porównanie profili transkryptomicznych plemników knurów o zróżnicowanej zdolności do kriokonserwacji nasienia (publikacja A25 oraz komunikaty P15, P16, P17)**

Aktualnie jestem współwykonawcą w projekcie NCN: *Analiza transkryptomów plemników knura i ich wpływ na jakość nasienia po kriokonserwacji*, którego kierownikiem jest prof. dr hab. Leyland Fraser. Celem badań jest identyfikacja genów o zróżnicowanej ekspresji w plemnikach knurów, których nasienie

charakteryzują się zróżnicowaną przydatnością do kriokonserwacji. Opracowaliśmy zmodyfikowaną metodę izolacji RNA z mrożonych plemników oraz wprowadziliśmy usprawnienia do procedury kontroli jakości wyizolowanego RNA (Fraser i in. 2017, Brym i in. 2018). Do porównania profili transkryptomycznych wykorzystano metodę RNA-seq na platformie Illumina NextSeq 500. Wstępne wyniki opracowane metodą DESeq2 wskazują na 52 transkrypty o zróżnicowanej ekspresji (Fraser i in. 2018), z których 38 ulega up-regulacji u osobników o mniejszej przydatności do kriokonserwacji nasienia. Wśród genów o zróżnicowanej ekspresji znajdują się m.in.: FOS - kodujący czynnik transkrypcyjny uczestniczący w proliferacji, różnicowaniu i apoptozie komórek, CPT2 - kodujący enzym uczestniczący w metabolizmie lipidów w mitochondriach oraz CCDC85A - kodujący białko związane z nieprawidłową spermatogenezą. Obecnie wyniki pomiarów ekspresji są potwierdzane z wykorzystaniem qRT-PCR na liczniejszej populacji knurów oraz przygotowywana jest publikacja.

## 7) PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO

Mój dorobek naukowy obejmuje łącznie **49** pozycji bibliograficznych w tym: **28 oryginalnych prac twórczych, 1 rozdział w monografii naukowej oraz 20 doniesień i komunikatów** prezentowanych na konferencjach międzynarodowych i krajowych. Wśród oryginalnych prac badawczych, **19** artykułów zostało opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR, kolejnych **8 pozycji** zostało opublikowanych w recenzowanych czasopiśmie, które w momencie publikacji nie miały wyliczonego wskaźnika IF, z **części A** wykazu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz jednej pozycji w języku polskim opublikowanej w periodyku wymienionym w **części B** wykazu czasopism MNiSW. **Cztery** publikacje stanowią cykl wskazany jako szczególne osiągnięcie w postępowaniu habilitacyjnym w oparciu o art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311).

Biorąc pod uwagę wartości wskaźników bibliometrycznych przypisanych zgodnie z rokiem wydania poszczególnych publikacji, łączna wartość dorobku naukowego w przeliczeniu na **punkty MNiSW** wynosi **445**, w tym **431** punktów zgromadzono po uzyskaniu stopnia doktora. Sumaryczny **Impact Factor** publikacji jest równy **18,07**. Według bazy bibliograficznej **Web of Science Core Collection**, **liczba cytowań** wynosi **211** zaś **Indeks Hirscha** ma wartość **8**.

Zestawienie dorobku naukowego z uwzględnieniem punktów MNiSW, wartości IF oraz liczby pozycji bibliograficznych przed i po uzyskaniu stopnia doktora przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. BIBLIOMETRYCZNE ZESTAWIENIE DOROBKU NAUKOWEGO

Pozycje bibliograficzne	Liczba pozycji/Punkty MNiSW/IF		
	Przed doktoratem	Po doktoracie	Razem
1. Publikacje naukowe w czasopismach z listy JCR, wymienionych w części A wykazu MNiSW	-	19/396/18,07	19/396/18,07
2. Publikacje naukowe w czasopismach recenzowanych, wymienionych w części A wykazu MNiSW	3/14/-	5/30/-	8/44/-
3. Publikacje naukowe w czasopismach wymienionych w części B wykazu MNiSW	-	1/2/-	1/2/-
4. Rozdziały w książkach/monografie	-	1/3/-	1/3/-
5. Doniesienia i komunikaty konferencyjne	2/-/-	18/-/-	20/-/-
<b>Łącznie</b>	<b>5/14/-</b>	<b>44/431/18,07</b>	<b>49/445/18,07</b>

MNiSW – Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

IF - Impact Factor zgodny z listą w bazie JCR (Journal Citation Reports)

