Karakterizacija markera u proteomu seruma purića nakon zaraze astrovirusima

Vugrinec, Tihana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:140676

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Tihana Vugrinec

Karakterizacija markera u proteomu seruma purića nakon zaraze astrovirusima

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Zavod za bolesti peradi s klinikom

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnik: Doc. dr. sc. Željko Gottstein

Mentori: doc. dr. sc. Željko Gottstein

doc. dr. sc. Anita Horvatić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. **Izv. prof. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić**
2. **doc. dr. sc. Anita Horvatić**
3. **doc. dr. sc. Željko Gottstein**

Zahvala

Ovom prilikom zahvaljujem svima koji su mi pomogli u izradi ovog rada, posebno zahvaljujem mentorima doc. dr. sc Željku Gottsteinu i doc. dr. sc. Aniti Horvatić na stručnoj pomoći i uloženom trudu i vremenu.

Također zahvaljujem i dr. sc. Gordani Nedeljković koja mi je uvelike pomogla pri praktičnom dijelu ovog rada.

Posebno zahvaljujem svojim kolegicama Dorotei i Hani uz koje je svaki dan bio lakši i veseliji.

Veliko hvala i mojoj obitelji i dečku Josipu što su uvijek bili uz mene.

Popis kratica :

PEC- (poult enteric complex),

PEMS- (poult enteritis and mortality sindrome),

PCR- (lančana reakcija polimerazom),

RT-PCR- (lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu),

TcOV-(korona virus purana),

ICTV- (International Committee for Taxonomy of Viruses)

NGS -(sekvenciranje nove generacije)

DNA-(deoksiribonukleinska kiselina)

RNA-(ribonukleinska kiselina)

TMT- (tandem mass tag)

BCA-(Bicinchoninic Acid)

PCA-(Principal component analysis)

Popis tablica i slika:

Slika 1. Dvodimenzionalni PCA prikaz proteomskih podataka koji pokazuje različito grupiranje uzoraka podrijetlom od astrovirus pozitivnih (zeleno) i negativnih (crveno) jata.

Slika 2. Grafički prikaz (engl. Volcano plot) različito eksprimiranih proteina kao posljedica astrovirusne zaraze.

Tablica 1. Proteini s najvećom promjenom u ekspresiji u serumu purića pozitivnih na astrovirus s opisom biološke funkcije i podrijetla

SADRŽAJ RADA

1.UVOD.....7

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA.....8

2.1.Etiologija.....8

2.2.Epizotiologija.....8

2.3.Klinička slika i patološke promjene.....9

2.4.Dijagnostika.....9

2.5.Proteomika.....10

3. MATERIJALI I METODE.....12

3.1.Uzorci tkiva i seruma korišteni u istraživanju.....12

3.2.Analiza proteoma (proteomska analiza).....12

3.3.Statistička i bioinformatička analiza.....13

4.REZULTAT.....14

4.1. Metagenomska analiza.....14

4.2. Proteomska analiza.....14

5.RASPRAVA.....18

6.ZAKLJUČAK.....20

7.POPIS LITERATURE.....21

8.SAŽETAK.....24

9.SUMMARY.....25

10. ŽIVOTOPIS.....26

1.UVOD

Istraživanju patogena kod životinja pridaje se sve veća važnost posebno nakon razvoja intenzivne proizvodnje, koja je uz velika ulaganja u peradarstvu jedna od najrazvijenijih. Probavni sustav, kao najveći sustav u organizmu koji je u stalnom kontaktu s vanjskom okolinom, česta je meta patogena. Najviše infekcija probavnog sustava događa se u prva tri tjedna života peradi, a gubici su višestruki. Prvenstveno zaražena perad je podložnija ostalim bolestima, pri čemu virusi najčešće uzrokuju primarna oštećenja te osiguravaju pogodno tlo bakterijama koje uzrokuju daljnja oštećenja. Ostali jednako važni razlozi su povećana smrtnost bolesnih jedinki, kao i nemogućnost da perad koja preboli infekciju dosegne genetski predisponirani maksimum proizvodnje (SAIF, 2020.). Identifikacija virusa započela je izumom elektronskog mikroskopa, ali samo na temelju morfologije. Danas uvelike pomažu molekularne metode koje su dovele i do identifikacije astrovirusa kao jednog od uzročnika bolesti probavnog sustava u purana (JINDAL i sur., 2014.).

Svrha ovog istraživanja je utvrditi utjecaj astrovirusne infekcije na serumske proteine jata purana koji su prirodno zaraženi uspoređujući njihove rezultate s uzorcima nezaraženog jata, a u svrhu detekcije potencijalnih frakcija u proteomu seruma koji bi se mogli koristiti kao markeri za rano prepoznavanje patoloških promjena. Primjenom molekularnih metoda sekvenciranja čitavog genoma prethodno je utvrđeno postojanje zaraze samo astrovirusima u jatu purana, dok je drugo jato bilo potpuno negativno na sve virusne patogene u različitim tkivima purića. Pretpostavka je da bi zaraza astrovirusima trebala dovesti do promjene u proteomu seruma pri čemu bi se neke proteine moguće moglo koristiti kao dijagnostički marker.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Etiologija

Astrovirusi su povezani s akutnim gastroenteritisom i PEMS-om u ptica (purani, kokoši), a uzrokuju još fatalni hepatitis kod pataka i nefritis kod kokoši (CATTOLI, 2020.). Astrovirusi su otkriveni 1975. elektronskim mikroskopom u uzorku dječje stolice. Ime su dobili po svom karakterističnom zvjezdolikom obliku (GUIX i sur., 2013.). To su virusi veličine 25-35 nm bez ovojnice, s jednostrukom RNA i spadaju u porodicu Astroviridae koja je podjeljena u 2 roda: Mamastrovirus (MastVs) koji zaražavaju sisavce, pri čemu je ICTV (International Committee for Taxonomy of Viruses) u ovom rodu opisala 6 vrsta, dok je u rodu Avastrovirus (AastVs) u koji spadaju ptičji sojevi, opisano 7 vrsta. Prema domaćinu u kojem su prvi put dokazani, AAstV se dijele na kokošje (CAstV i virus ptičjeg nefritisa; ANV), puranske (TAstV-1 i 2) i pačje (DAstV-1 i 2). Identifikacijom virusnih sekvenci ANV je potvrđen kao najčešće dokazan virus. Virus obavija čvrsta kapsida te se može umnažati inokuliran u puranske zametke i za pet dana naći u crijevima ili Fabricijevoj burzi. Većina zaraženih zametaka ima proširena crijeva, ispunjena tekućnom (JINDAL i sur., 2014.). Astrovirusi purana (TAstVs- Turkeyastroviruses) su širom rasprostranjeni, te su podjeljeni na 2 serotipa, TAstV-1 i TastV-2. Općenito TAstV-2 je više proširen u odnosu na TastV-1. (PEROT i sur., 2017.). TAstV je prvi put identificiran 1980. u crijevnom sadržaju peradi sa znakovima proljeva (LOJKIĆ i sur., 2010.).

2.2. Epizootiologija

Astroviroza je uobičajena poslije sedmog dana života, a obično se očituje unutar prva četiri tjedna života. Kod starijih nije uobičajena. Zaraza se prenosi feko-oralnim putem preko onečišćene stelje, hrane ili vode. Smatralo se da je astrovirus specifičan za pojedinu vrstu peradi, no dokazalo se da se prenosi i među vrstama. Virus se nalazi u crijevnom sadržaju

purića prije kliničkih znakova. Izlučivanje virusa izmetom prestaje prije pojave simptoma i nastanka lezija, pa tako virus nije moguće izdvojiti kod purića u kliničkoj fazi bolesti. Astrovirus se umnaža u enterocitima uzduž resica, a da pritom ne uzrokuje atrofiju resica. Mortalitet obično nije visok za razliku od morbiditeta. Iako ovo nije bolest opasna po život, uzrokuje značajne ekonomske gubitke u smislu smanjenog prirasta oboljelih (JINDAL i sur., 2014.).

2.3. Klinička slika i patološke promjene

Simptomi se razvijaju između prvog i trećeg tjedna života, a traju 10-14 dana. Javlja se proljev, nevoljkost, gutanje stelje i plašljivost. Simptomi su uglavnom slabi do srednje jaki, a većina purića preboli bolest, no ostaju kržljavi. Purići zaraženi astrovirusom imaju vodenast, pjenušav, žutosmeđi izmet. Razudbom se kod zaraženih purića nalaze punokrvna i dilatirana crijeva. Histopatološki je karakteristično da astrovirusi ne uzrokuju atrofiju crijevnih kripti, no moguća je vidljiva blaga hiperplazija. Iako je glavni uzrok proljevu virusna replikacija, virusni kapsidni protein također može uzrokovati akutni proljev djelujući kao enterotoksin (CATTOLI, 2020.).

2.4. Dijagnostika

Sumnja na astrovirusnu infekciju može se postaviti na temelju vodenog i pjenušavog proljeva. S obzirom da se radi o probavnom sustavu koji je podložan napadu mnogih patogena, vrlo je bitno isključiti ostale bolesti poput koronavirusnog enteritisa purana (TcOV), sindroma maldigestije, zaostajanja u rastu, sindroma malapsorpcije purića, PEMS (poult enteritis and mortality sindrome), sindroma smrtnosti purana i virusnog enteritisa purana. Svi navedeni uzročnici spadaju u PEC (poult enteric complex). Da bi se potvrdila dijagnoza potrebno je izolirati i identificirati astrovirus. Virus je prvi put dijagnosticiran elektronskim mikroskopom. Nedostatak ove metode je dijagnostika isključivo po morfološkim karakteristikama te je vrlo lako zamijeniti astrovirus za neki drugi enterovirus. Osim toga, kod životinja koje pokazuju znakove virus se više ne nalazi u crijevima pa je rezultat često lažno negativan. Dosad se najboljim pokazao RT-PCR (JINDAL i sur., 2014.). Upravo je svrha ovog istraživanja

pokušati dokaz virusa baziran na genomu nadopuniti proteomikom te utvrditi mogućnost pronalaska novih dijagnostičkih markera u slučaju zaraze virusima, u ovom slučaju astrovirusima. Primjena molekularne dijagnostike bazirane na genomu imaju svoju visoku vrijednost u dijagnostici, a kroz razvoj novih metoda se pojednostavljuje, ubrzava i pojeftinjuje sam postupak (TWYMAN, 2012.).

2.5. Proteomika

Proteini su biološke molekule neophodne za odvijanje procesa unutar stanice, te predstavljaju ekspresiju genoma, bilo domaćina ili patogena, koji se mogu koristiti u dijagnostici za dokaz bolesti, ali i praćenje oporavka organizma (TWYMAN, 2012.). Proteom je ukupan broj proteina koje eksprimira stanica, tkivo ili organ, te ukazuje na funkciju, modifikacije proteina te kako proteini međudjeluju s drugim molekulama, a ovim područjem bavi se proteomika (SHAH i MISRA, 2011.). Za razliku od genoma, proteom nije statičan već varira obzirom na vrstu stanice, stupanj razvoja organizma, patofiziološko stanje kao i na utjecaj okoliša. Kao što se sekvence nukleotida razlikuju među pojedinim mikroorganizmima, tako se razlikuju i sekvence aminokiselina odgovarajućeg proteina. Zbog same složenosti proteoma, proteomika mora biti selektivna i osjetljiva. Proteomika, iako relativno nova metoda, ima velik potencijal u dijagnostici. Sastoji se od različitih tehnoloških i metodoloških pristupa, no zbog kompleksnosti uzoraka ne postoji jedinstvena metoda. Uz to, potrebni su različiti sofisticirani instrumenti i posebni računalni programi zbog same složenosti analiza (TWYMAN, 2012.). Osnovne zadaće proteomike su identifikacija i kvantifikacija proteina, detekcija biomarkera u svrhu dijagnostike, praćenje tijeka bolesti te identifikacija potencijalnih meta za razvoj novih lijekova. Spektrometrija masa je metoda koja je sve popularnija danas, a između ostalog može služiti proučavanju (astrovirusne) virusne replikacije (MURILLO i sur., 2015.), odgovora domaćina na virusnu replikaciju te za identifikaciju biomarkera. Kvantitativne metode s druge strane određuju količinu ekspresije pojedinog proteina ovisno o njegovoj funkciji unutar stanice. Proteomika je disciplina koja spaja kemiju, biologiju i informatiku. Za svaku životinjsku vrstu postoji baza podataka koja služi za identifikaciju proteina (HIXON i sur.,

2017.). S obzirom da je baza podataka za identifikaciju proteina purana nedovršena (MARQUES i sur., 2019.), u ovom radu je korištena baza podataka koja sadrži proteine purana i pilića (Meleagris gallopavo i Gallus gallus FASTA podaci). FASTA je tekstualni format koji služi za prikazivanje sljedova aminokiselina ili nukleinskih kiselina unutar proteina/gena pri čemu je svaki nukleotid ili aminokiselina prikazan jednim slovom (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blastcgihelp.shtml). Svrha identifikacije proteina je izolirati proteine, razdvojiti ih separacijskim tehnikama i identificirati potencijalne biomarkere čija je svrha potvrda bolesti. Ranija istraživanja pokazala su da se rezultati analize proteoma mogu kasnije uspješno koristiti kao brzi dijagnostički testovi (HOLT i GAST, 2002.). No, za purana ima malo analiza proteoma (LUO i sur., 2013.), no sličnost s kokoši omogućuje potencijalno unakrižno korištenje nekih kitova za proteine akutne faze (HOLT i GAST, 2002.; TAKIMOTO i sur., 2008.; GARCIA i sur., 2009.; MATULOVA i sur., 2013.)

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci tkiva i seruma korišteni u istraživanju

Praćenjem zdravstvenog stanja kod prethodnih jata na farmi tovnih purana, genetike Hybrid, uočeni su klinički znakovi pjenušavog proljeva i problemi povećanog mortaliteta u prvim tjednima života purića. Uočena je razlika u pojavnosti navedenih problema između pojedinih jata porijeklom od različitih dobavljača. Na pretragu je dostavljeno 15 purića porijeklom od dva različita dobavljača dobi 5 i 13 dana. Izvađena je krv i odvojen serum koji je do daljnje analize čuvan na -80 ˚C. Nakon žrtvovanja, uzeti su skupni uzorci tkiva slezene i tankog crijeva od pet jedinki koji su do daljnje analize čuvani na -80 ˚C. Prethodno provedenom dijagnostikom na pohranjenim tkivima crijeva i slezene (GOTTSTEIN i sur., neobjavljeno) metagenomikom primjenom sekvenciranja nove generacije (NGS) utvrđeno je prisustvo samo astrovirusa u jednom jatu purića, dok je drugo jato bilo negativno na sve viruse.

3.2. Analiza proteoma (proteomska analiza)

Za proteomsku analizu korišteni su uzorci seruma čuvani na -80 ˚C primjenom„shotgun“ TMT (engl. Tandem Mass Tag) kvantitativnog pristupa prethodno opisanog (HORVATIĆ i sur., 2019.) koji omogućava multipleksiranje – istovremenu analizu do 16 uzorka obilježenih različitim izobarnim privjescima (TMT). Ukratko, prvo je određena ukupna koncentracija proteina BCA postupkom (Thermo Scientific, Rockford, SAD), nakon čega je dodan interni standard kako bi se rezultati za pojedine uzorke mogli međusobno uspoređivati. Količina od 35 µg serumskih proteina i internog standarda kroz nekoliko je koraka pročišćena, istaložena i tretirana tripsinom koji je proteine razgradio na kraće peptide. U slijedećem su koraku peptidi obilježeni TMT six pleks reagensom (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) prema uputama proizvođača, a dobiveni uzorci čuvani su na -80 ˚C do analize.

Vezane tehnike tekućinska kromatografija i tandemna spektrometrija masa (LC-MS/MS) visoke rezolucije korištene su za analizu TMT-obilježenih uzoraka primjenom tekućinskog kromatografa Ultimate 3000 RSLCnano system (Dionex, Germering, Germany) i spektrometra masa Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) kao što je prethodno opisano (HORVATIĆ i sur., 2019.).

Za identifikaciju i relativnu kvantifikaciju proteina korišten je SEQUEST algoritam unutar računalnog programa Proteome Discoverer (verzija 2.3., Thermo Fisher Scientific). Baza podataka korištena u analizi temeljena je na FASTA podacima vrsta Meleagris gallopavo i Gallus gallus (korišteno iz NCBI baze u razdoblju 06/06/2019, 29324 unosa; i 29/1/2020, 48387 unosa). Postotak krivih očitanja (eng. false discovery rate, FDR) prilikom identifikacije peptida izračunat je putem Percolator algoritma unutar računalnog programa Proteome Discoverer i postavljen je na 1%. Proteini s barem dva peptida (jedan jedinstven) i 5% FDR smatrani su pouzdano identificirani te su korišteni u daljnjim analizama.

3.3.Statistička i bioinformatička analiza

Za statističku obradu podataka korišten je računalni program R v3.2.2 (Team 2013). Prvo su primjenom Dixon's testa u paketu *outliers* v0.14 (KOMSTA, 2011) uklonjene ekstremne vrijednosti koje su bile na razini značajnosti $P < 0.05$, a razlike u količini proteina među skupinama su potom testirane primjenom Wilcoxon-Mann-Whitney testa. Razlika u ekspresiji između dvije skupine izračunata je prema srednja vrijednost (skupina 2)/srednja vrijednost (skupina 1) i izražena u log2 bazi. PCA i raspršeni grafički prikaz (volcano plot) izrađeni su primjenom ggplot2 v3.1.1 (WICKHAM, 2009) paketa u R programu.

Za bioinformatičku analizu korištene su različite javno dostupne bioinformatičke platforme kako bi proteine prilagodilo za daljnju analizu, (https://david.ncifcrf.gov/conversion.jsp) DAVID i UniProtKB (https://www.uniprot.org/uploadlists/), te kako bi ih se što točnije identificiralo i utvrdila njihova uloga kao i međusobna povezanost u organizmu (STRINGdb v11.0 (https://string-db.org/), KEGG Pathways, REACTOME Pathways)

4. REZULTATI

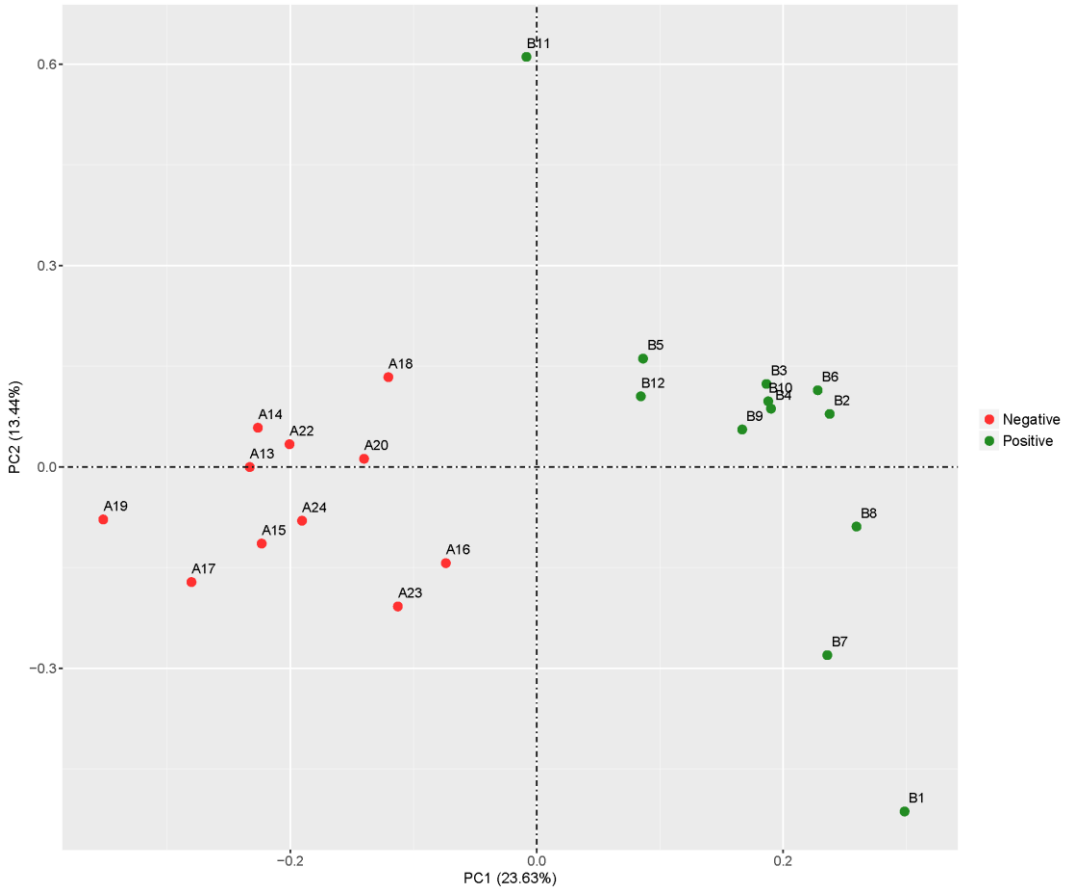
4.1. Metagenomska analiza

Prethodno provedeni dijagnostički postupci na uzorcima crijeva i slezene purića podrijetlom iz dva različita jata primjenom metagenomske analize pokazali su da je jato dobi 13 dana pozitivno samo na puranski astrovirus u tkivu crijeva i slezene, dok je mlađe jato u potpunosti negativno na sve viruse te je korišteno kao negativna kontrola za usporedbu seruma.

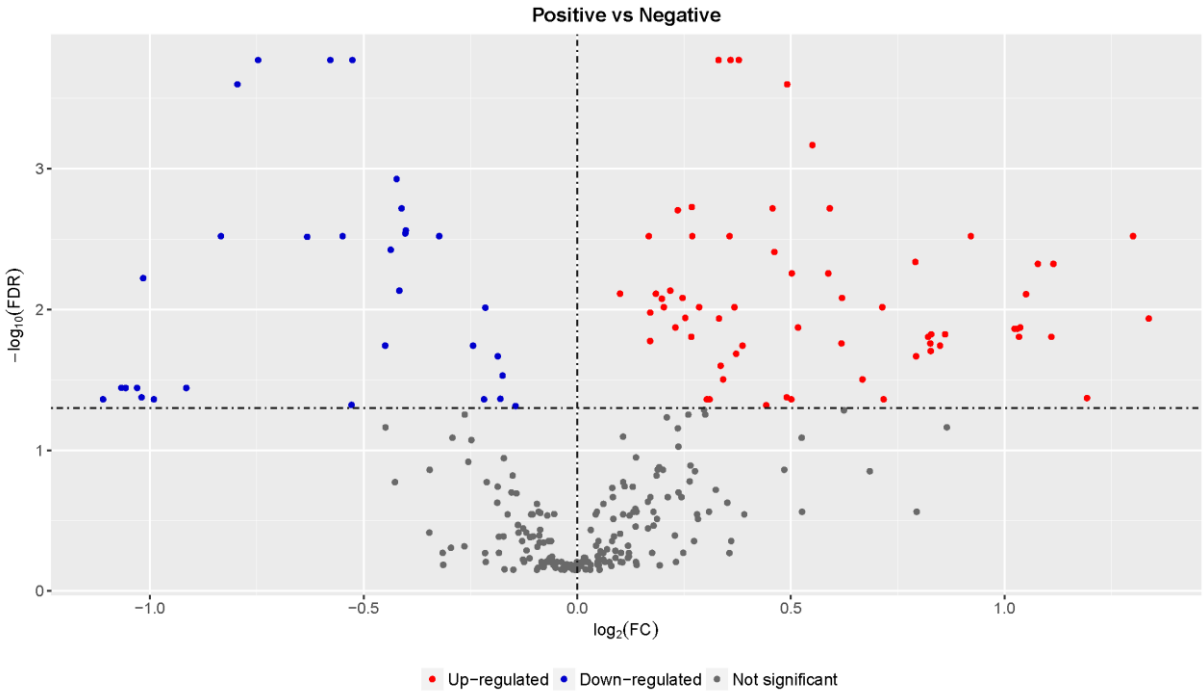
4.2. Proteomska analiza

Proteomskom analizom utvrđeno je ukupno 1758 različitih proteina, od čega je iz analize isključeno 1217 zbog nepostojanja barem dva jedinstvena peptida, a 541 protein je korišten u daljnjoj statističkoj analizi. Od toga je za daljnju bioinformatičku analizu korišten 171 protein sa značajnom razlikom u ekspresiji između astrovirus-pozitivnog i negativnog jata.

Analiza proteoma seruma purića pokazuje jasno razlikovanje proteomskih podataka podrijetlom od astrovirus-pozitivnog jata u odnosu na negativno jato (Slika 1). Daljnjom analizom identificirano je 68 jedinstvenih proteina, od kojih je 22 podeksprimirano, a 46 pojačano eksprimirano kao posljedica zaraze astrovirusom (Slika 2). Proteini s najvećom razinom promjene u ekspresiji, bilo pojačano ili oslabljeno, prikazani su u Tablici 1, kao mogući kandidati za dijagnostičke markere. Tako npr. podjedinica alfa-A hemoglobina i J lanca imunoglobulina imaju najviše pojačanu ekspresiju u odnosu na negativno kontrolno jato, dok su proteinski fragmenti fibrinogena podeksprimirani.



Slika 1. Dvodimenzionalni PCA prikaz proteomskih podataka koji pokazuje različito grupiranje uzoraka podrijetlom od astrovirus pozitivnih (zeleno) i negativnih (crveno) jata.



Slika 2. Grafički prikaz (engl. Volcano plot) različito eksprimiranih proteina kao posljedica astrovirusne zaraze.

Tablica 1. Proteini s najvećom promjenom u ekspresiji u serumu purića pozitivnih na astrovirus s opisom biološke funkcije i podrijetla

Pristupni broj	**P -vrijednost**	**FDR**	**log2FC**	**Gen**	**Opis**
326929282	0.002	0.012	1.338	HBA	PREDICTED: hemoglobin subunit alpha-A [Meleagris gallopavo]
326918888	0.000	0.003	1.301	IGJ	PREDICTED: immunoglobulin J chain [Meleagris gallopavo]
733884064	0.011	0.036	-1.030	FGG	PREDICTED: fibrinogen gamma chain [Meleagris gallopavo]
733884061	0.015	0.044	-1.109	FGB	PREDICTED: fibrinogen beta chain [Meleagris gallopavo]

5. RASPRAVA

Svrha ovog rada bila je utvrditi utjecaj astrovirusne infekcije na serumske proteine purana koji su prirodno zaraženi, uspoređujući njihove uzorke s uzorcima zdravih purića negativnih na prisustvo virusa, a sve s ciljem dokaza potencijalnih frakcija proteoma seruma koji bi se u budućnosti koristili kao biomarkeri za brže i lakše otkrivanje i praćenje bolesti i liječenja. Iako ova bolest ne uzrokuje visoki mortalitet, itekako je značajna iz ekonomskog pogleda jer dugoročno uzrokuje smanjeni prirast kod rekonvalescentnih životinja. Pokazalo se da sprega genomike i proteomike može značajno pridonijeti u razjašnjavanju patogeneze i interakcije domaćina i patogena (MARQUES i sur., 2019.). Suvremene metode u proteomici i genomici to ubrzavaju i pojednostavljuju dajući nam mogućnost odabira najpovoljnijeg kandidata ili nekoliko njih iz šume rezultata. Rezultati metagenomike poslužili su za identifikaciju jata pozitivnog samo na astrovirus kao i jata negativnog na ovu, ali i ostale virusne zaraze. Kako astrovirusi mogu značajno narušiti zdravlje purića u prvih nekoliko tjedana života, njihov dokaz i praćenje ima veliku važnost u daljnjem postupanju sa zaraženim jatom, kako u smislu simptomatske terapije i opskrbe elektrolitima i lako probavljivim pripravcima u svrhu što bržeg oporavka, tako i u smislu jačanja biosigurnosnih mjera kojima je cilj spriječiti ulazak uzročnika na farmu, kao i njegovo širenje na druga prijemljiva jata. Proteomske analize koje su do sad rađene na peradi uglavnom obuhvaćaju piliće (Gallus gallus) te ima vrlo malo analiza proteoma purića (LUO i sur., 2013.).

Kako je zaraza u većem broju životinja i u svom početku često asimptomatska, potrebno je monitoringom utvrditi postojanje zaraze i procijeniti rizik za njene moguće posljedice (CATTOLI, 2020.). Upravo primjenom markera podrijetlom od domaćina, purića, možemo procijeniti njihov zdravstveni status i mogući rani patogeni učinak patogena na organizam. Navedenim rezultatima možemo unaprijed reagirati na postojeću zarazu kroz spomenute postupke jačanja nespecifične obrane u probavnom traktu. U slučaju proboja bolesti možemo procijeniti obim mogućih šteta te pratiti oporavak organizma. Kako za isti marker moguće može doći do promjene u ekspresiji posljedično kod virusa različite etiologije, postoji mogućnost njegove primjene tijekom čitave proizvodnje s ciljem praćenja zdravstvenog stanja

probavnog trakta, budući različiti virusi kao ciljni organ upravo imaju crijevnu sluznicu (SAIF, 2020.). Takav univerzalni marker putem jednostavnog postupka dokazivanja imao bi široku primjenu u praksi na farmama, budući su problemi od strane probavnog trakta u uzgojima purana vrlo česti. Proteini poput podjedinice alfa-A hemoglobina i J lanca imunoglobulina koji imaju najviše pojačanu ekspresiju, ili proteinski fragmenti fibrinogena koji su najviše podeksprimirani, u odnosu na negativno jato, mogu imati osobine markera. Moguće je da se proteini poput podjedinica alfa-A hemoglobina prilikom zaraze astrovirusima pojačano izlučuju u serum te da se uz prikladan brzi test, poput dip-sticka, mogu brzo, jednostavno i jeftino dokazati na samoj farmi. Ono što je važno je utvrditi i njihovu biološku ulogu u patogenezi same zaraze.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem analize rezultata može se zaključiti slijedeće:

- Proteomska analiza jasno pokazuje postojanje razlika u proteomu između seruma podrijetlom od zaraženog u odnosu na nezaraženo jato

- Postoji razlika u ekspresiji 68 proteina između seruma podrijetlom od zaraženih u odnosu na nezaražene puriće, bilo u pojačanoj ili smanjenoj ekspresiji

- Proteomskom analizom bioinformatičkim alatima utvrđena je biološka uloga navedenih proteina u organizmu

7. POPIS LITERATURE

1. BUCHFINK, B., XIE, C., HUSON, D.H. (2015): Fast and sensitive protein alignment using diamond. Nature Methods 12, 59–60.

2. CATTOLI, G. (2020): Astrovirus Infections: Diseases of Poultry (Ur. SWAYNE, D.E, BOULIANNE, M., LOGUE, C.M., MCDOUGLAD, L.R., NAIR, V., SUAREZ, D.L.), Wiley-Blackwell, Hoboken, NY, SAD, 416-420.

3. GARCIA, K.O, BERCHIERI-JÚNIOR, A., SANTANA, A.M., FREITAS-NETO, O.C., FAGLIARI, J.J. (2009): Experimental infection of commercial layers using a Salmonella enterica serovar Gallinarium strain: Leukogram and serum acute-phase protein concentrations. J. Poultry Science 11(4), 263-270.

4. GUIX, S., BOSCH, A., PINTO, R.M. (2013): Astrovirus taxonomy: Astrovirus Research (Ur. SCHULTZ-CHERRY, S.), Springer Nature, Švicarska, 97-118.

5. HALL, R.J., WANG, J., TODD, A.K., BISSIELO, A.B, YEN,S., STRYDOM, H., MOORE, N.E., REN, X., HUANG Q.S., CARTER,P.E., PEACEY, M. (2014.): Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. J.Virological Methods 195, 194-204.

6. HIXSON, K. K., LOPEZ-FERRER, D., ROBINSON, E.W., PAŠA-TOLIĆ, LJ. (2017): Proteomics: Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition) (Ur. LINDON, J., TRANTOR, G. E., KOPPENAAL, D.), Academic Press, SAD, 766-773.

7. HOLT, P.S., GAST, R.K. (2002): Comparison of the effects of infection with Salmonella enteritidis, in combination with an induced molt, on serum levels of the acute phase protein, 1 acid glycoprotein, in hens. Poultry Science 81, 1295-1300.

8. HORVATIĆ, A., GUILLEMIN, N., KAAB, H., MCKEEGAN, D., O'REILLY, E., BAIN, M., KULEŠ, J., ECKERSALL, P.D. (2019): Quantitative proteomics using tandem mass tags in relation to the acute phase protein response in chicken challenged with Escherichia coli lipopolysaccharide endotoxin. J. Proteomics 192, 64-77.

9.JINDAL, N., MOR, S.K., GOYAL, S.M. (2014): Enteric viruses in turkey enteritis. Virus disease 25(2), 173–185.

10. LOJKIĆ, I., BIĐIN, M., PRPIĆ, J., ŠIMIĆ, I., KREŠIĆ, N., BEDEKOVIĆ, T. (2016.): Faecal virome of red foxes from periurban areas. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 45, 10-15.

11.LOJKIĆ, I., BIĐIN, M., BIĐIN, Z., MIKEC, M. (2010.): Viral agents associated with poult enteritis in Croatian commercial turkey flocks. Acta Veterinaria Brno 79, 91–98.

12. LUO, J., ZHENG, A., MENG, K., CHANG, W., BAI, Y., LI, K., CAI, H., LIU, G., YAO, B. (2013.) Proteome changes in the intestinal mucosa of broiler (Gallus gallus) activated by probiotic Enterococcus faecium. J. Proteomics 91, 226–241.

13. MARQUES, A.T, ANJO, S.I., BHIDE, M., VARELA COELHO, A., MANADAS, B., LECCHI, C., GRILLI, G., CECILIANI, F. (2019): Changes in the intestinal mucosal proteome of turkeys (Meleagris gallopavo) infected with haemorrhagic enteritis virus. Veterinary Immunology and Immunopathology 213, 109880.

14.MATULOVA, M., VARMUZOVA, K., SISAK, F., HAVLICKOVA, H., BABAK, V., STEJSKAL, K., ZDRAHAL, Z., RYCHLIK, I.(2013): Chicken innate immune response to oral infection with Salmonella enterica serovar Entiritidis. Veterinary Research 44(1), 37-47.

15. MURILLO, A., VERA-ESTRELLA, R., BARKLA, B.J., MÉNDEZ, E., ARIAS, C.F. (2015): Identification of Host Cell Factors Associated with Astrovirus Replication in Caco-2 Cells. J. Virology 89 (20), 10359-70.

16. PEROT, P., LECUIT, M., ELOIT, M. (2017): Astrovirus diagnostics. Viruses 9(1), 10.

17. SAIF, Y.M. (2020): Viral Enteric Infections: Diseases of Poultry (Ur. SWAYNE, D.E, BOULIANNE, M., LOGUE, C.M., MCDOUGLAD, L.R., NAIR, V., SUAREZ, D.L.), Wiley-Blackwell, Hoboken, NY, SAD, 401-402.

18. SHAH, T.R., MISRA, A. (2011): Proteomics: Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics (Ur. MISRA, A.) Elsevier Inc., 387-427.

19.TAKIMOTO, T., SATO, K., AKIBA, Y., TAKAHASHI, K. (2008): Role of chicken tl1a on inflammatory responses and partial characterization of its receptor. J. Immunology 180(12), 8327-8332.

20. TWYMAN, R.M. (2012): Proteomics : Encyclopedia of Applied Ethics (Second Edition). Garland Science, NY, SAD, 642-649.

21. UYAGUARI-DIAZ, M.I., CHAN, M., CHABAN, B.L., CROXEN, M.A., FINKE, J.F., HILL, J.E., PEABODY, M.A., VAN ROSSUM, T., SUTTLE, C.A., BRINKMAN, F.S.L., ISAAC-RENTON, J., PRYSTAJECKY, N.A., TANG, P. (2016): A comprehensive method for amplicon-based and metagenomic characterization of viruses, bacteria, and eukaryotes in fresh water samples. Microbiome 27, 31–36.

8. SAŽETAK

Karakterizacija markera u proteomu seruma purića nakon zaraze astrovirusima

Tihana Vugrinec

Cilj svake uspješne proizvodnje peradi je zadržati zdravlje jata. No upravo su mlade jedinke s najizraženijim potencijalom rasta najpodložnije zarazi patogenima. Probavni sustav je zbog svoje funkcije stalno izložen raznim mikroorganizmima od kojih su neki i poželjni dok oni drugi svojim štetnim djelovanjem izravno koče rast i razvoj same jedinke. U ovom istraživanju analiziran je utjecaj astrovirusne infekcije na serumske proteine purića s ciljem pronalaženja potencijalnih markera kojima bi se moguće patološke promjene detektirale već prije početka bolesti. Za ovo istraživanje korišteni su serumi 15 purića te uzorci slezene i tankog crijeva 5 purića, linija Hybrid, dobi 5 i 13 dana. Prethodnom dijagnostikom su u uzorcima slezene i tankog crijeva, metagenomikom primjenom sekvenciranja nove generacije, dokazani astrovirusi u jata dobi 13 dana te odsustvo virusa u drugom jatu, koje je korišteno kao negativna kontrola prilikom kasnije analize proteoma seruma. Za identifikaciju i relativnu kvantifikaciju proteina seruma korišten je SEQUEST algoritam unutar računalnog programa Proteome Discoverer. Kako bi se proteine točnije identificiralo i kako bi se definirala njihova uloga u organizmu koristili smo programe STRINGdb v11.0, KEGG Pathways, REACTOME Pathways. Analiza proteoma pokazala je jasnu razliku proteomskih podataka jata pozitivnog na astroovirus u odnosu na negativno jato. Identificirano je 68 jedinstvenih proteina, od kojih je 46 pojačano eksprimirano, a 22 podeksprimirano, te se moguće mogu koristiti kao dijagnostički markeri za dokaz i praćenje zaraze astrovirusom ili drugim crijevnim ili sistemskim virusima.

Ključne riječi: puran, Astrovirus, zaraza, metagenomika, serum, proteomika

9.SUMMARY

Marker characterization in turkey serum proteome after astrovirus infection

Tihana Vugrinec

The goal of every successful poultry industry is maintaining the health of the flock. But, young birds with the most prominent growth potential are the category that is the most prone to infection. Gastrointestinal tract is, because of its function, constantly exposed to various microorganisms, some of which are desirable, while others are harmful to the growth and health of an individual. In this paper we conducted research on the impact of astroviral infection to the serum proteins of turkey poults, with the goal of finding potential markers for the detection of pathological changes before the clinical onset of the disease. For this research we used serums of 15 poults and spleen and small intestine samples of 5 poults, of Hybrid genetics, of 5 and 13 days of age. Previous diagnostics done on the spleen and small intestine samples, with metagenomics using next generation sequencing, showed the presence of astroviruses in 13 days old flock, while younger flock was negative for all viruses and it was used as a negative control for later serum proteome analyses. Algorithm from the computer programe „Proteome discoverer“ was used for identification and relative quantification of serum proteins. To identify proteins and their roll in organisms we used STRINGdb v11.0, KEGG Pathways, REACTOME Pathways. Proteome analysis showed a significant difference between positive and negative flock. Among 171 serum proteins with significant abundance changes between healthy and infected turkeys, 68 of them were unique proteins, from which 46 of them were overexpressed, and 22 under-expressed. In conclusion, 68 proteins could be possible markers for diagnostics and follow up of astrovirus or other enterovirus or systemic virus infection.

Keywords: turkey, Astrovirus, infection, metagenomics, serum, proteomics

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 16.03.1995. godine u Čakovcu. Nakon osnovne škole koju sam pohađala u Ivanovcu upisala sam Gimnaziju Josipa Slavenskog u Čakovcu. Završetkom gimnazije upisujem Veterinarski fakultet u Zagrebu, a tokom studija volontiram na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju. Kasnije sam se zainteresirala za perad, pa sam iz tog razloga upravo Zavod za bolesti peradi s klinikom odabrala za izradu diplomskog rada. Također sam bila na stručnoj praksi u Sloveniji u sklopu ERASMUS programa.